



Développement d'architectures innovantes associant capteurs acoustiques et matériaux polymères à empreintes moléculaires pour la détection de biomarqueurs de cancer

Naïma Lebal

► To cite this version:

Naïma Lebal. Développement d'architectures innovantes associant capteurs acoustiques et matériaux polymères à empreintes moléculaires pour la détection de biomarqueurs de cancer. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0411 . tel-01341558

HAL Id: tel-01341558

<https://theses.hal.science/tel-01341558>

Submitted on 4 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR
SPÉCIALITÉ ÉLECTRONIQUE

Par Naïma LEBAL

**Développement d'architectures innovantes associant
capteurs acoustiques et matériaux polymères à empreintes
moléculaires pour la détection de biomarqueurs de cancer**

Sous la direction de : Dominique REBIERE
Co-directrice : Corinne DEJOURS

Soutenue le 14/12/2015

Membres du jury :

Mme	SALAÜN, Anne-Claire	Maître de conférences	Université de Rennes 1	Rapporteur
M.	TEMPLE-BOYER, Pierre	Directeur de recherche	CNRS DR Midi-Pyrénées	Rapporteur
M.	DELEPEE, Raphaël	Professeur	Université de Caen Basse Normandie	Examineur
M.	AGROFOGLIO, Luigi	Professeur	Université d'Orléans	Examineur
Mme	DEJOURS, Corinne	Professeur	Bordeaux INP/ENSEIRB-MATMECA	Directrice
M.	REBIERE, Dominique	Professeur	Université de Bordeaux	Directeur
Mme	HALLIL, Hamida	Maître de conférences	Université de Bordeaux	Examinatrice

« Tout obstacle renforce la détermination. Celui qui s'est fixé un but n'en change pas »

Léonard De Vinci

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers mon directeur de thèse Dominique REBIERE, Professeur à l'Université Bordeaux 1, qui m'a honorée de sa confiance en m'acceptant au sein de son équipe et a toujours veillé au bon déroulement de ma thèse. A travers nos échanges, je me suis enrichie de son ouverture d'esprit, de sa sensibilité, de ses qualités en communication scientifique et de sa vision à long terme.

Ma codirectrice de thèse, Corinne DEJOURS, Professeur à l'Institut Polytechnique de Bordeaux, m'a encadrée de plus près et m'a appris la rigueur de la démarche scientifique tout en m'accordant une autonomie dans la gestion du projet. Je lui adresse mes sincères remerciements pour sa disponibilité, son écoute, son extrême gentillesse et ses valeureux conseils.

Mes directeurs de thèse m'ont ainsi apporté chacun leurs savoir être et savoir-faire qui me sont aujourd'hui indispensables dans ma vie professionnelle.

Dans le cadre de ce projet financée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), j'ai été amenée à échanger avec les différents partenaires du consortium que je remercie chaleureusement. Je pense particulièrement aux Professeurs Luigi AGROFOGLIO, Raphaël DELEPEE, Patrick FAVETTA, Maître de conférences, qui ont alimenté nos réflexions autour des polymères à empreintes moléculaires. Par ailleurs, il m'a été très agréable de travailler en étroite collaboration avec Aleksandra à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) ainsi qu'à Bordeaux.

Je remercie Jean-Luc LACHAUD, Ingénieur d'études au Laboratoire IMS, qui s'est impliqué dans ce projet à travers la mise en œuvre des bancs de mesure et Vincent RAIMBAULT, Chargé de Recherche CNRS, pour sa contribution à l'élaboration des dispositifs microfluidiques. Les membres de l'équipe ont toujours été disponibles, sympathiques et ouverts pour de nouvelles idées. Je tiens également à remercier Bernard Plano pour sa participation à l'étape de caractérisation des films polymères grâce à son expertise en microscopie électronique à balayage.

Merci à toutes les personnes agréables que j'ai côtoyées au laboratoire IMS ainsi qu'à l'IUT de Bordeaux.

Je remercie tous mes amis et mes collègues de travail qui m'ont encouragée et qui s'impatientent de fêter ma soutenance. Merci à toutes les personnes qui suivaient de près l'avancement de mes travaux et qui n'ont cessé de me témoigner toute leur sympathie.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mes parents, mes frères et sœur et toute ma famille qui m'ont soutenue moralement et financièrement, durant toutes ces années d'études. Je leur dois tout ce que je vis de beau.

Le monde de la recherche m'a également permis de trouver l'amour. Ainsi, je remercie Thibaud pour toute la fantaisie qu'il apporte à ma vie.

Table des matières

Table des matières	5
Liste des figures	12
Liste des tableaux	19
Nomenclature des abréviations utilisées	21
Introduction générale	23
I. Le cancer colorectal un enjeu sociétal : problématique de la détection	26
I.1. Introduction	26
I.2. Statistiques du cancer colorectal	26
I.2.1. Le cancer colorectal dans le monde	26
I.2.2. Le cancer colorectal en France	28
I.3. Outils de diagnostic actuels du cancer colorectal	29
I.3.1. Détection précoce et dépistage	29
I.3.1.1. Programme national du dépistage du cancer colorectal : Un choix de santé publique	29
I.3.1.2. Une stratégie en deux temps	29
• Premier temps : le test au gaïac	30
• Deuxième temps en cas de positivité du test : la coloscopie	30
I.3.2. Une nouvelle génération de tests : les tests immunologiques	31
I.3.3. Le Coloscanner ou la coloscopie sans douleur	32
I.3.4. La génétique moléculaire des cancers	32
I.4. Les biomarqueurs du cancer : une technique de diagnostic non invasive	33

I.4.1.	Les biomarqueurs de cancer dans les fluides corporels	35
I.4.2.	Les nucléosides urinaires comme biomarqueurs de cancer	38
I.4.3.	Les biomarqueurs volatils	40
I.5.	Rythmes circadiens :	41
I.5.1.	La perturbation du rythme circadien lors d'un cancer	42
I.5.2.	Le suivi et l'adaptation de la chimiothérapie selon le rythme circadien pour le cancer colorectal.....	43
I.6.	Les biocapteurs comme outils de diagnostic pour le cancer	44
I.6.1.	L'élément de reconnaissance moléculaire.....	44
I.6.1.1.	Les anticorps	45
I.6.1.2.	Les polymères à empreintes moléculaires	46
I.6.1.3.	Les peptides	47
I.6.1.4.	Les aptamères.....	47
I.6.2.	Le transducteur	48
I.6.2.1.	Les transducteurs électrochimiques	48
I.6.2.2.	Les transducteurs optiques	49
I.6.2.3.	Les transducteurs mécaniques.....	50
I.6.2.4.	Les microantennes	50
I.6.2.5.	Le marquage électromagnétique	51
I.7.	Conclusion	56
II.	Les polymères à empreintes moléculaires	58
II.1.	Introduction	58
II.2.	Association des polymères à empreintes moléculaires aux capteurs piézoélectriques	59
II.2.1.	Principe de la technique d'impression moléculaire.....	59
II.2.2.	Avantages de l'association des polymères à empreintes moléculaires aux capteurs piézoélectriques.....	60

II.2.3. Exemples d'association de polymères à empreintes moléculaires à des capteurs piézoélectriques dans la littérature	63
II.3. La synthèse des polymères à empreintes moléculaires et leur intégration sur les capteurs piézoélectriques.....	67
II.3.1. Réactifs utilisés pour la synthèse de MIPs	68
II.3.1.1. Les amorceurs	68
II.3.1.2. Les monomères fonctionnels	69
II.3.1.3. Les monomères réticulants	71
II.3.1.4. Le solvant porogène	73
II.3.1.5. Les cibles	73
• Elimination de la molécule cible	74
• Réinsertion de la molécule cible	74
II.3.2. Les techniques d'immobilisation des MIPs à la surface des capteurs piézoélectriques	80
II.3.2.1. Immobilisation par piégeage physique ou couplage chimique	80
II.3.2.2. Immobilisation “ in situ ” à la surface du transducteur	81
• Préparation des SAMs	81
• La photopolymérisation	81
• La formation du MIP	82
II.3.2.3. Electropolymérisation	82
II.3.3. D'une technologie de reconnaissance volumique au développement d'une solution couche mince	82
II.4. Les caractéristiques analytiques des polymères à empreintes moléculaires associés aux capteurs piézoélectriques.....	87
II.4.1. La sensibilité des capteurs piézoélectriques associés aux MIPs	87
II.4.2. La sélectivité des polymères à empreintes moléculaires	88
II.4.3. Autres propriétés analytiques	90

II.4.4.	Les capteurs MIP pour la détection en milieu gazeux	91
II.4.5.	Les capteurs MIP pour la détection en milieu liquide.....	92
II.5.	Conclusion	93
III.	Association du capteur acoustique à onde de Love à un dispositif microfluidique	95
III.1.	Introduction	95
III.2.	Le capteur à onde de Love	95
III.2.1.	Structure de la ligne à retard.....	95
III.2.2.	La sensibilité à l'effet de masse.....	97
III.2.3.	Caractérisation électrique des capteurs à ondes de Love	98
III.2.4.	Réponse fréquentielle	99
III.3.	La microfluidique pour les applications biomédicales	100
III.3.1.	Avantages de la microfluidique dans les analyses biomédicales	100
III.3.2.	Techniques de fabrication des dispositifs microfluidiques intégrés aux laboratoires sur puce.....	102
III.3.3.	Laboratoires sur puces commerciaux pour la détection de pathogènes.....	103
III.4.	Banc de mesure expérimental.....	105
III.4.1.	Conception et réalisation des puces PDMS microfluidiques.....	105
III.4.1.1.	Motif des chambres d'analyse des puces microfluidiques	106
III.4.1.2.	Le moule des puces microfluidiques	107
III.4.1.3.	Tests de compatibilité de la puce PDMS avec les solutions utilisées pour les mesures	110
III.4.2.	Cellule de test adaptée aux puces PDMS	112
III.4.3.	Système d'injection microfluidique.....	114
III.4.3.1.	Les pousse-seringues	114
III.4.3.2.	Les avantages des pousse-seringues pour les applications microfluidiques	

III.4.3.3. Les inconvénients des pousse-seringues pour les applications microfluidiques.....	115
III.4.4. Système d'injection régulé en pression Elveflow.....	116
III.4.5. Multiplexeur microfluidique.....	118
III.5. Système électronique d'acquisition en temps réel.....	120
III.5.1. Système d'acquisition de données.....	121
III.5.2. Véhicule de test	122
III.6. Conclusion.....	122
IV. Mise au point du protocole de dépôt du polymère à empreintes moléculaire en couche mince.....	125
IV.1. Introduction	125
IV.2. Dépôt de couches minces du MIP pour la détection d'AMP	125
IV.2.1. Protocole de dépôt : Description des opérations technologiques	126
IV.2.1.1. Nature du substrat.....	126
IV.2.1.2. Nettoyage.....	126
IV.2.1.3. Activation Piranha.....	126
IV.2.1.4. Fonctionnalisation de la surface : silanisation.....	127
IV.2.1.5. Préparation de la solution prépolymérisée	129
• La molécule cible AMP.....	129
• Protocole de préparation de la solution MIP/AMP	131
IV.2.1.6. Dépôt par centrifugation (Spin-coating).....	133
• Principe du dépôt à la tournette.....	133
• Dépôts par centrifugation (spin-coating) sur substrats rectangulaires	135
• Tests préliminaires de dépôt.....	138
IV.2.1.7. Polymérisation.....	142
IV.2.2. Caractérisation des couches minces du MIP-AMP	144

IV.2.2.1.	Profilométrie mécanique et optique	144
IV.2.2.2.	Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	148
IV.2.3.	Compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique	152
IV.3.	Dépôts de couches minces du MIP pour la détection de Pseudouridine	155
IV.3.1.	Protocole de dépôt	156
IV.3.1.1.	MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel BAAPy	156
IV.3.1.2.	MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel HALL	158
IV.3.1.3.	Dépôt	159
IV.3.1.4.	Polymérisation.....	159
IV.3.2.	Caractérisation des couches minces du MIP-pseudouridine par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	160
IV.3.3.	Compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique	162
IV.3.3.1.	MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel BAAPy	163
IV.3.3.2.	MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel HALL	164
IV.4.	Dépôts de couches minces du MIP pour la détection de 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG)	165
IV.4.1.	Protocole de dépôt	167
IV.4.1.1.	Préparation de la solution prépolymérisée	167
IV.4.1.2.	Dépôt	169
IV.4.1.3.	Polymérisation.....	169
IV.4.2.	Caractérisation des couches minces du MIP- 8-hydroxy-2'deoxyguanosine par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	170
IV.4.3.	Compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique	171
IV.5.	Conclusion.....	173
V.	Détection d'analogues de nucléosides en milieu liquide.....	175
V.1.	Introduction	175

V.2. Détection d'analogue de nucléosides en régime statique	175
V.2.1. Détection d'adénosine mono phosphate en régime statique	176
V.2.1.1. Extraction des empreintes	176
V.2.1.2. Réinsertion de la molécule cible	176
V.2.1.3. Caractérisation électrique des capteurs à couches minces MIP-AMP	176
V.2.2. Détection de pseudouridine en régime statique	181
V.2.2.1. Extraction des empreintes	181
V.2.2.2. Réinsertion des empreintes de pseudouridine :	181
V.2.2.3. Caractérisation électrique des couches minces du MIP-pseudouridine	182
• MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel BAAPy	182
• MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel HALL	184
V.2.3. Détection de 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG)	187
V.2.3.1. Extraction des empreintes	187
V.2.3.2. Réinsertion de la molécule cible	187
V.2.3.3. Caractérisation électrique des couches minces du MIP- 8-hydroxy-2'deoxyguanosine	188
V.3. Détection d'analogue de nucléosides en régime hydrodynamique (temps réel)	191
V.3.1. Détection d'adénosine mono phosphate en régime hydrodynamique	191
V.3.2. Tests de sélectivité	194
V.4. Conclusion	196
Conclusion générale	198
Annexe 1	201
Annexe 2	202
Annexe 3	206
Références bibliographiques	209

Liste des figures

Chapitre I : Le cancer colorectal un enjeu sociétal : problématique de la détection

Figure I. 1 Les vingt cancers les plus répandus dans le monde, estimations de 2008	27
Figure I. 2 Les vingt cancers les plus mortels à travers le monde, estimations de 2008.....	27
Figure I. 3 Le test Hemoccult II	30
Figure I. 4 Coloscopie avec contrôle de l'image.....	31
Figure I. 5 Les types de biomarqueurs et leurs champs d'application	33
Figure I. 6 Les nucléosides urinaires les plus communs considérés comme des biomarqueurs de cancer (verts : disponibles dans le commerce, oranges : difficiles à commander, rouges : non disponibles dans le commerce)	39
Figure I. 7 Structure générale d'un anticorps (Barbas et al. , 1997)	46
Figure I. 8 Structure d'un aptamère	48
Figure I. 9 L'image de droite représente une vue du dessus d'un capteur microantenne avec une ligne représentant une coupe transversale schématisée à gauche. Des anticorps sont immobilisés à la surface de la région active sur capteur du haut tandis que l'antenne du bas a capturé des antigènes (D. Arruda et al. , 2009).	51

Chapitre II : Les polymères à empreintes moléculaires

Figure II. 1 Schéma réactionnel de la préparation de MIPs	60
Figure II. 2 Evolution du nombre de publications autour des MIPs de 2004 à 2015 (<i>Données Mip data base</i>).....	62
Figure II. 3 Croissance des capteurs piézoélectriques, optiques, électrochimiques à base de MIPs de 2004 à 2015 (Données Mip data base).....	62
Figure II. 4 Les techniques d'impression en surface appliquées à des QCMs : (a) La solution monomère aqueuse contenant la molécule empreinte est versée à la surface du transducteur pour l'auto organisation des sites de reconnaissances à la surface de la couche mince. (b) Un tampon à forte densité de trypsine est appliqué à la surface du dépôt prépolymérisé, les empreintes sont extraites après polymérisation (M. Hussain et al., 2013).	64

Figure II. 5 Image obtenue par microscopie fluorescente d'une cellule de levure (<i>S. cerevisiae</i>) en phase S marquée par du fluorochrome bisbenzimidazole (Seidler et al., 2009).....	65
Figure II. 6 Protocole d'impression des cellules de levure : la solution est déposée à la tournette (2,500 rpm) à la surface d'une couche de polyurethane (PU)	65
Figure II. 7 Image AFM d'un duplex en MIP de la cellule de levure (dimensions latérales 20×20 µm, axe vertical 5 µm) et les empreintes des duplex des cellules (microscopie optique, 20 × 25 µm).....	66
Figure II. 8 (a) Image AFM d'un tampon de cellules artificiel (dimensions latérales 20×20 µm, axe vertical 5 µm), (b) Image par microscopie optique du même tampon (125 × 100 µm). (c) Image AFM du MIP polyurethane résultant d'un tampon artificiel.	66
Figure II. 9 Un aperçu du transport des molécules et du solvant dans un protocole de séparation par membrane (R. Ghosh, 2006).....	90

Chapitre III : Association du capteur acoustique à onde de Love à un dispositif microfluidique

Figure III. 1 Capteur à onde de Love (H. Tarbague, 2011).....	96
Figure III. 2 Décalage de la réponse de phase en transmission suite à un ajout de masse sur le capteur à onde acoustique	97
Figure III. 3 Caractérisation des capteurs à ondes de Love à l'analyseur de réseau.....	98
Figure III. 4 Réponse fréquentielle observée à l'analyseur de réseau: (a), amplitude, (b) phase	100
Figure III. 5 Aperçu schématique des systèmes de détections de pathogènes s'appuyant sur la microfluidique.	101
Figure III. 6 Masque avec les motifs des chambres fluidiques à reproduire sur un « Wafer » de silicium (3 pouces de diamètre et 1000 µm d'épaisseur) avec motifs microfluidiques en SU8.(a)ancien motif, (b) motif avec contours adoucis.....	106
Figure III. 7 Motif microfluidique 2D avec contours arrondis	107
Figure III. 8 Vue éclatée du moule en aluminium.....	108
Figure III. 9 Photographie des parties du moule en aluminium : de gauche à droite 1) la base, 2) la pièce centrale, 3) le dispatcheur 4) le couvercle et 5) le wafer en silicium avec les motifs en SU8 logé dans la base.....	109
Figure III. 10 La puce microfluidique en PDMS : (a) photographie de la puce démoulée, (b) image 3D sous Inkscape.....	110

Figure III. 11 La cellule de mesure avec la puce PDMS et le capteur : (a) Vue éclatée de la cellule (b) photographie de la cellule vissée avec le couvercle et les connecteurs SMA	114
Figure III. 12 Pousse-seringue modèle NE-1000 de New Era	115
Figure III. 13 Différentes vues du système d'injection régulé en pression Elveflow®	117
Figure III. 14 Photographie des réservoirs utilisés avec le système OB1	118
Figure III. 15 Multiplexeur microfluidique : (a) Masque avec les motifs du multiplexeur fluidique à reproduire sur un « Wafer » de silicium (3 pouces de diamètre et 1000 μm d'épaisseur) avec motifs microfluidiques en SU8 (b) photographie de la puce réalisée	119
Figure III. 16 Description du dispositif expérimental. Deux pousse-seringues sont reliés à une vanne permettant la sélection du liquide à injecter dans la chambre fluidique, un compteur de fréquence assure un suivi en temps réel de la fréquence.....	120
Figure III. 17 Description du banc de mesure pour la détection d'AMP en temps réel.....	120
Figure III. 18 Synoptique (a) et photographie (b) de la carte d'acquisition des données.	121
Figure III. 19 Réponses en fréquence en temps réel de capteurs : mesures comparatives avec deux systèmes de mesure de la fréquence (compteur Agilent et carte développée).	121
Figure III. 20 Photographie du dispositif intégrant l'électronique de conditionnement du capteur	122

Chapitre IV : Mise au point du protocole de dépôt du polymère à empreintes moléculaire en couche mince

Figure IV. 1 Photographie du capteur acoustique à onde de love.....	126
Figure IV. 2 Structure chimique de la molécule de silane γ -MAPS (3- [(methacryloyl)oxypropyl]trimethoxysilane) www.sigmaaldrich.com	128
Figure IV. 3 Principe de la silanisation par γ -MAPS (J. Courtois, 2006).....	128
Figure IV. 4 Représentation des étapes de traitement de surface des substrats avant le dépôt des couches de MIP	129
Figure IV. 5 Clichés MEB avec différentes magnifications d'un capteur ayant subi une activation Piranha et une silanisation pendant une nuit.	129
Figure IV. 6 Schéma et structure générale de l'adénosine monophosphate.....	130
Figure IV. 7 Les quatre principales étapes du protocole de spin-coating (G.A. Luurtsema, 1997).....	134
Figure IV. 8 Localisation de la couche mince de polymère à empreinte moléculaire sur la zone centrale de la double ligne à retard et dessin du masque de Kapton®	137

Figure IV. 9 Photographie de la tournette (spin-coater).....	137
Figure IV. 10 Représentation de l'étape de dépôt de MIP à la tournette	138
Figure IV. 11 Enceinte de polymérisation sous atmosphère inerte.....	142
Figure IV. 12 Interactions des différents réactifs du MIP pour former le film à la surface du capteur	143
Figure IV. 13 Etapes du protocole de dépôt de la solution MIP/AMP	144
Figure IV. 14 Photographies par profilomètre à stylet de films minces de MIP/AMP, de différentes épaisseurs, déposés à la surface sur des capteurs acoustiques (zoom : 600x): (a)50 nm, (b) 100 nm , (c)200 nm , (d) 500 nm.....	145
Figure IV. 15 Image 3 D par profilométrie optique d'un dépôt à la surface d'un capteur sans nettoyage piranha ni silanisation.	146
Figure IV. 16 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (34 nm, vitesse 2500 rpm), b) image 3 D de surface.	146
Figure IV. 17 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (130 nm, vitesse 2300 rpm), b) image 3 D de surface. ..	146
Figure IV. 18 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (230, vitesse 2200 rpm nm), b) image 3 D de surface. ..	147
Figure IV. 19 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (380 nm, vitesse 2100 rpm), b) image 3 D de surface. ..	147
Figure IV. 20 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (500 nm, vitesse 2000 rpm), b) image 3 D de surface. ..	147
Figure IV. 21 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (800 nm, vitesse 1500 rpm), b) image 3 D de surface. ..	148
Figure IV. 22 Clichés MEB de couches MIP-DMSO déposées sur des échantillons silicium avant extraction de la molécule empreinte en fonction de l'épaisseur: a) et b) 1.4µm, c) et d) 200 nm.....	149
Figure IV. 23 Représentation schématique de la structure macroporeuse d'un MIP selon la nature du porogène, A) porogène à faible pouvoir solvant, B) porogène à fort pouvoir solvant (N. Omar-Aouled, 2013) adaptée de (M. H. Mohamed et al., 2012).....	150
Figure IV. 24 Clichés MEB de couches MIP-DMSO déposées sur des capteurs avant extraction de la molécule empreinte en fonction du temps de mélange de la solution MIP: a) 1h, b) 3h et c) 6h.....	151
Figure IV. 25 Comparaison de deux clichés MEB d'une couche : (a) NIP-DMSO et d'une couche (b) MIP-DMSO d'une épaisseur de 1.4 µm.....	152

Figure IV. 26 Réponse en transmission du capteur en termes de : (a) pertes d'insertion (d), phase associée (dépôt de 500 nm d'épaisseur).....	153
Figure IV. 27 Réponse en transmission du capteur en termes de : (a) pertes d'insertion, (d) phase associée	154
Figure IV. 28 Structure chimique du : (a) nucléoside pseudouridine, (b) monomère fonctionnel non covalent 2,6 bisacrylamidopyridine (BAAPy)et (c) monomère fonctionnel SL-118 (Patent,2012,A.Hall)	155
Figure IV. 29 Structure chimique de 2 ',3',5'-O-triacyl-uridines, molécule analogue du nucléoside pseudouridine	156
Figure IV. 30 Clichés MEB avec différents agrandissements de couches MIP-Chloroforme pour la détection de Pseudouridine déposées sur des échantillons en silicium avant extraction de la molécule empreinte (1µm).	161
Figure IV. 31 Clichés MEB avec différents agrandissements de couches MIP-Chloroforme pour la détection de Pseudouridine déposées sur des capteurs avant extraction de la molécule empreinte (200 nm).	162
Figure IV. 32 (a) Réponse en phase du capteur (b) Pertes d'insertion associées.....	163
Figure IV. 33 (a) Réponse en phase du capteur (b) Pertes d'insertion associées au même capteur	164
Figure IV. 34 Structure chimique du biomarqueur 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG) www.sigmaaldrich.com	165
Figure IV. 35 représentation schématique de la formation du polymère autour de la molécule empreinte 8-OHdG (A. Eröz et al. 2008).	166
Figure IV. 36 Clichés MEB avec différents agrandissements de couches MIP-DMSO pour la détection de 8-OHdG déposées sur des échantillons en silicium avant extraction de la molécule empreinte guanosine : (a) ×8000, (b) ×20000.	170
Figure IV. 37 Clichés MEB avec différents agrandissements de couches NIP-DMSO pour la détection de 8-OHdG déposées sur des échantillons en silicium avant extraction de la molécule empreinte guanosine : (a) ×8000, (b) ×20000.	171
Figure IV. 38 Réponse en transmission S21 du capteur avant et après dépôt du MIP (Epaisseur 500 nm) (a) Pertes d'insertion et (b) réponse en phase du capteur	172

Chapitre V : Détection d'analogues de nucléosides en milieu liquide

Figure V. 1 Pertes d'insertion et réponse en phase du capteur pour une concentration de 145 ppm d'AMP.....	177
Figure V. 2 Pertes d'insertion et réponse en phase du capteur pour une concentration de....	178
Figure V. 3 Variations en fréquence (en valeur absolue) suite à une série de recaptures successives de 25ppm d'AMP pour trois capteurs ayant subi les mêmes paramètres de dépôt.	179
Figure V. 4 Variations en fréquence (en valeur absolue) suite à une série de recapture de 25ppm d'AMP pour des capteurs avec différentes épaisseurs de couche sensible de polymère imprimé.	180
Figure V. 5 Variations en fréquence (en valeur absolue) suite à une série de recapture de 25ppm d'AMP pour deux capteurs ayant subi des temps d'extraction différents.	181
Figure V. 6 (a) Réponse en phase du capteur R1B pour une recapture d'une solution de pseudouridine de 5ppm. (b) Pertes d'insertion associées au même capteur	183
Figure V. 7 (a) Réponse en phase du capteur R13B pour une recapture d'une solution de pseudouridine de 5ppm. (b) Pertes d'insertion associées au même capteur	184
Figure V. 8 (a) Réponse en phase du capteur R13H pour une recapture d'une solution de pseudouridine de 5ppm. (b) Pertes d'insertion associées au même capteur	184
Figure V. 9 (a) Réponse en phase du capteur R20D8H suite à une recapture d'une solution de pseudouridine d'une concentration de 5ppm, (b) Pertes d'insertion associées au même capteur	185
Figure V. 10 (a) Réponse en phase du capteur R20D9H suite à une recapture d'une solution de pseudouridine d'une concentration de 5ppm, (b) Pertes d'insertion associées au même capteur	186
Figure V. 11 (a) Réponse en phase du capteur R31A11H suite à une recapture d'une solution de pseudouridine d'une concentration de 5ppm, (b) Pertes d'insertion associées au même capteur	186
Figure V. 12 Représentation du protocole d'extraction des empreintes guanosine des couches de MIP	187
Figure V. 13 Fréquences mesurées du capteur acoustique à onde de Love (R5H) correspondantes au minimum des pertes d'insertion en gain pour chacune des étapes	

suivantes : 1) Avant dépôt du MIP, 2) Après dépôt du MIP/guanosine, 3) Après extraction de la guanosine, 4) Après recapture de 100 ppm de 8-OHdG, 5) Après un premier lavage à l'acétonitrile, 6) Après ue première élution à l'acide acétique/Méthanol, 7) Après recapture de 10 ppm 8-OHdG, 8)Après un second lavage à l'acétonitrile, 9) Après une seconde élution à l'acide acétique/Méthanol.	189
Figure V. 14 Fréquences mesurées du capteur acoustique à onde de Love (R5B) correspondant au minimum des pertes d'insertion pour chacune des étapes suivantes : 1) Avant dépôt du MIP, 2) Après dépôt du MIP/guanosine, 3) Après extraction de la guanosine, 4) Après recapture de 100 ppm de 8-OHdG, 5) Après un premier lavage à l'acétonitrile, 6) Après une première élution à l'acide acétique/Méthanol, 7) Après recapture de 10 ppm 8-OHdG, 8)Après un second lavage à l'acétonitrile, 9) Après une seconde élution à l'acide acétique/Méthanol.	190
Figure V. 15 Variation de fréquence en temps réel pour différentes concentrations d'AMP	192
Figure V. 16 Recaptures successives d'une solution d'AMP à une concentration de 300 ppm jusqu'à saturation.	193
Figure V. 17 Variation de fréquence totale en fonction du temps de passage cumulé d'AMP (300 ppm) pour deux lignes à retard soumises aux mêmes conditions de dépôt.	194
Figure V. 18 Nucléotides utilisées pour les tests de adenosine-3'-monophosphate, recapture en temps réel: (a) adenosine-5'-monophosphate, (b) (c) cytidine-5'-monophosphate, (d) 2-phosphonomethoxypropyladenine.	194
Figure V. 19 Recaptures successives d'une solution de PMPA à une concentration de 300ppm jusqu'à saturation.	195
Figure V. 20 (a) Dynamiques de réponses de la même ligne à retard avec MIP-AMP exposée à des solutions d'AMP, de PMPA, de 3'AMP et CMP d'une concentration de 300 ppm, (b) facteurs de sélectivité déterminés pour le MIP-AMP par la méthode HPLC (R. Delépée et al. 2010).	196

Liste des tableaux

Chapitre I : Le cancer colorectal un enjeu sociétal : problématique de la détection

Tableau I. 1 Les biomarqueurs associés au pronostic et au diagnostic de différents cancers..	35
Tableau I. 2 Les seuils de présence dans le sérum humain de quelques biomarqueurs de tumeur (I.E. Tothil et al. 2009).....	36
Tableau I. 3 Les nucléosides dont le niveau augmente en présence de tumeur (L. Agrofoglio et al. 2010).....	39
Tableau I. 4 Exemples de biocapteurs dédiés à l'analyse des biomarqueurs de cancer.....	53

Chapitre II : Les polymères à empreintes moléculaires

Tableau II. 2 Structure des amorceurs radicalaires les plus couramment utilisés pour la préparation de MIPs	69
Tableau II. 3 Monomères fonctionnels commercialisés pour la synthèse de MIPs par voie non covalente (B. Claude, 2007).....	70
Tableau II. 4 Agents réticulant commerciaux (P-A.G. Cormack et al., 2004).....	72
Tableau II. 4 Les MIPs associés aux capteurs piézoélectriques pour les applications de détection (le tableau de la revue de (M. Avila et al. 2008) a été complété par des références plus récentes).....	74
Tableau II. 5 Sommaire d'approches de préparation de couches minces de MIP pour des applications de détection	85

Chapitre III : Association du capteur acoustique à onde de Love à un dispositif microfluidique

Tableau III. 1 Les systèmes fluidiques commerciaux pour la détection de pathogènes	104
Tableau III. 2 Dimensions et masse des échantillons PDMS.....	111
Tableau III. 3 Evolution au cours du temps du poids des échantillons PDMS plongés dans les solutions de test	112

Chapitre IV : Mise au point du protocole de dépôt du polymère à empreintes moléculaire en couche mince

Tableau IV. 1 Liste des protocoles de silanisation étudiés par la technique SPX, les mesures d'angle de contact et les tests d'adhérence (J. Courtois et al., 2006).....	127
Tableau IV. 2 Les différents réactifs utilisés pour la préparation d'une solution stock de MIP et leurs structures chimiques	132
Tableau IV. 3 Essais de spin-coating réalisés avec une solution de MIP AMP sur des capteurs	139
Tableau IV. 4 Paramètres retenus suite aux essais de dépôts par centrifugation (spin-coating) réalisés avec une solution de MIP AMP sur des capteurs.....	143
Tableau IV. 5 Formulation de la composition de la solution prépolymérisée de MIP/BAAPY	157
Tableau IV. 6 Proportions des réactifs utilisés pour la préparation de la solution prépolymérisée de MIP/BAAPY	157
Tableau IV. 7 Formulation de la composition de la solution prépolymérisée de MIP/HALL	158
Tableau IV. 8 Proportions des réactifs utilisés pour la préparation de la solution prépolymérisée de MIP/HALL.....	159
Tableau IV. 9 Paramètres retenus pour les dépôts de MIP/Pseudouridine à base des monomères fonctionnels BAAPY et HALL.	160
Tableau IV. 10 Les différents réactifs utilisés pour la préparation d'une solution stock de MIP/8-OHdG et leurs structures chimiques	168
Tableau IV. 11 Paramètres retenus pour les dépôts de MIP/HALL.....	169

Chapitre V : Détection d'analogues de nucléosides en milieu liquide

Tableau V. 1 Les variations de fréquence et de gain enregistrées suite à l'extraction et la recapture dans une solution de 5 ppm de pseudouridine pour les capteurs R1H, R13B et R13H.	183
Tableau V. 2 Les variations de fréquence et de gain enregistrées suite à l'extraction et la recapture d'une solution de pseudouridine d'une concentration de 5ppm pour les lignes à retard R20D8H, R20D9H et R31A11H.	185

Nomenclature des abréviations utilisées

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMP : Adénosine Monophosphate

ARN: Acide ribonucléique

BAW: Bulk Acoustic Wave

CRC: *Colorectal Carcinoma*

ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

GMR : Capteurs Magnéto-Résistifs

Hb : Hémoglobine

HIV-1 : Virus d'immunodéficience type 1

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

IDT : Transducteurs interdigités

INCa : Institut National du Cancer

Kd : Constante de dissociation

LOC: *Lab-on-a-chip*

LODs : *Limit Of Detection*

MEMS : Micro Electromechanical Systems

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MIP : *Molecularly imprinted polymer*

MQCM : *Multichannel quartz crystal microbalance*

NIP : *Non Imprinted Polymer*

NPs : Nanoparticules

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PECVD : *Plasma Enhanced Vapor Deposition*

POC : *Point of Care*

PSA : *Prostate Specific Antigen*

Psi : Pseudouridine

PZ : Piézoélectriques

QCM : *Quartz Crystal Microbalance*

QDs : *Quantums dots*

PDMS : PolyDiMethylSiloxane
SAMs: *Self-assembled monolayers*
SAW: *Surface Acoustic Wave*
SEPPRA: *Serological proteome analysis*
SEREX: *Serological expression*
Spin-coating : Enduction par force centrifuge
SPR : *Surface Plasmon resonance*
TSM: *Thickness Shear Mode*
μTAS : *Micro Total Analysis Systems*
UV : Ultra-violet
VOC : *Volatile Organic compound*

Introduction générale

Les chiffres des statistiques du cancer colorectal en France et dans le monde montrent la nécessité de développement de plateformes technologiques plus rapides, sensibles et spécifiques pour assurer le diagnostic du cancer. Un diagnostic rapide va ainsi aider à améliorer l'état de santé et réduire le temps d'attente des résultats qui peut être un grand facteur de stress pour les patients. Les outils actuels de diagnostic du cancer sont invasifs, coûteux, nécessitent beaucoup de temps et un personnel hospitalier formé, c'est ainsi que des recherches plus poussées sont développées pour identifier la malignité du cancer sans avoir recours à des outils invasifs.

L'analyse des biomarqueurs dans le sang, les urines et autres fluides corporels est l'une des méthodes appliquées pour la détection précoce de la maladie. Dans le cadre de ce projet des nucléosides urinaires ont été identifiés comme biomarqueurs pour le cancer colorectal. Quelques travaux ont montré la pertinence des rythmes circadiens dans l'excrétion de nucléosides urinaires pour des patients sains par rapport à des patients atteints de cancer. Par conséquent, ces marqueurs reflétant la perturbation du rythme circadien lors de la prolifération du cancer permettraient d'adapter les prestations de traitement selon les dynamiques temporelles de prolifération des cellules cancéreuses pour chaque patient.

Dans la littérature de nombreuses plateformes de détection de biomarqueurs de cancer existent. Parmi les éléments de reconnaissance de biomarqueurs comme les anticorps, les peptides et les aptamères, les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) semblent attrayants du fait de leur facilité de préparation, leur grande stabilité thermique et chimique et leur robustesse. Par ailleurs, différents transducteurs ont été utilisés pour la reconnaissance de biomarqueurs de cancer dont les transducteurs acoustiques à ondes de surface se démarquent par leur sensibilité en milieu liquide.

Financée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), à travers le projet CancerSensor (programme TECSAN), cette thèse s'est déroulée au sein de l'équipe MDA (Microsystèmes de Détection Acoustique) du laboratoire IMS (Intégration du Matériau au Système). L'équipe MDA mène des travaux allant de l'intégration de matériaux innovants à l'étude, la réalisation, et la caractérisation de dispositifs et plateformes pour un spectre large d'applications, en privilégiant la détection acoustique.

Dans le cadre de ce projet, nous avons proposé une solution technologique de détection et de suivi de biomarqueurs du cancer colorectal. Notre choix de la stratégie de détection s'est porté sur les polymères à empreintes moléculaires comme élément de reconnaissance des biomarqueurs. Celui-ci sera associé à un transducteur acoustique à ondes de Love mis au point lors de travaux précédents au sein de l'équipe MDA. Le biocapteur ainsi développé va cibler les nucléosides mis en évidence pour le cancer colorectal.

Les différents marqueurs de cancer et les plateformes de détection disponibles pour le diagnostic, le pronostic du cancer et la surveillance de la récurrence de la maladie sous forme de dispositif POC (*Point Of Care*) seront abordés dans le premier chapitre. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux nucléosides comme marqueurs tumoraux pour le cancer colorectal. Ces marqueurs tumoraux dans les urines variant selon le rythme circadien sont de bons indicateurs pour la personnalisation de la chronothérapie du cancer afin d'améliorer le pronostic des patients du cancer du côlon à l'état métastatique. Afin de situer notre contribution, les différentes plateformes de détection existantes dans la littérature pour les biomarqueurs de cancer seront rapportées. A partir des différents éléments de reconnaissance et des transducteurs étudiés, une stratégie de détection des nucléosides sera identifiée pour la suite de nos travaux.

Dans le chapitre II, l'évolution de l'utilisation des MIPs comme matériaux sélectifs associés aux capteurs piézoélectriques (PZ) pour la détection de petites molécules est présentée et discutée. Nous soulignerons les caractéristiques analytiques et le potentiel pratique des capteurs piézoélectriques associés aux MIPs qui combinent les avantages de sélectivité des MIPs à la sensibilité de la détection piézoélectrique. Avec une analyse des différents types de détection, nous résumerons les stratégies d'intégration, décrirons les applications des MIPs associés aux capteurs PZ rapportés dans la littérature et montrerons leurs réelles possibilités d'application dans un futur proche.

La géométrie et les caractéristiques électriques et électromagnétiques de la plateforme de transduction utilisable en milieu liquide seront décrites dans le chapitre III. Pour nos travaux nous avons choisi un capteur acoustique à ondes de Love. L'objectif de ces travaux étant de détecter les analogues de nucléotides en milieu liquide, le capteur devait être associé à une plateforme microfluidique. Par ailleurs, le système d'acquisition en temps réel utilisé pour la détection des analogues de nucléotides est présenté.

Le chapitre IV est consacré à l'adaptation d'un protocole de MIP volumique en couche mince pour l'intégrer à la surface du capteur acoustique. Les traitements de surface nécessaires pour greffer le polymère de manière covalente seront détaillés. Nous exposerons également les caractérisations électriques des dispositifs après l'étape de dépôt pour valider la propagation de l'onde. Par ailleurs, l'état de surface des films et leurs épaisseurs seront évalués. Une fois ce protocole validé, nous l'appliquerons à d'autres polymères pour la détection de pseudouridine et de 8-OHdG.

Le dernier chapitre sera consacré aux résultats de détection d'analogues de nucléosides. Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests en régime statique. Dans ce cas de figure les capteurs subissent différents traitements d'extraction de l'empreinte et de recapture de la molécule cible. Les dispositifs sont caractérisés électriquement après chaque étape afin d'évaluer l'effet de l'impression sur la réponse fréquentielle. Ces tests seront par la suite appliqués aux polymères à empreintes moléculaires à base de pseudouridine et 8OHdG adaptés en couches minces et décrits dans le chapitre précédent.

La seconde partie du chapitre est consacrée à nos travaux axés sur la détection d'analogues de nucléosides en temps réel. Pour ces tests, nous avons utilisé la configuration détaillée dans le chapitre III, où le capteur/MIP est associé au système micro fluidique et inséré dans un dispositif de conditionnement électronique afin d'enregistrer les variations de fréquence en temps réel. Ces tests de détection sont appliqués à l'adénosine monophosphate pour évaluer la sensibilité de l'ensemble capteur à onde Love/MIP. La sélectivité envers des molécules proches de l'AMP sera également étudiée en utilisant cette configuration.

I. Le cancer colorectal un enjeu sociétal : problématique de la détection

I.1. Introduction

La première partie de ce chapitre est consacrée à des statistiques d'incidence et de mortalité par cancer colorectal en France et dans le monde. Ces informations s'appuient sur les publications de l'Institut National du Cancer (INCa). La partie suivante de ce chapitre portera sur les outils de diagnostics actuels avec comme exemple de la détection précoce, le programme national français de dépistage. Ces outils de diagnostic tendent vers des méthodes non invasives comme le coloscanner et la génétique moléculaire. Celle-ci a pour vocation l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer des thérapies ciblées contre celles-ci. Ce chapitre abordera par la suite les différents marqueurs de cancer et les plateformes de détections disponibles pour le diagnostic, le pronostic du cancer et la surveillance de la récurrence de la maladie sous forme de dispositif POC (*Point Of Care*). Nous nous intéresserons plus particulièrement aux nucléosides comme marqueurs tumoraux pour le cancer colorectal. Ces marqueurs tumoraux dans les urines variant selon le rythme circadien sont de bons indicateurs pour la personnalisation de la chronothérapie du cancer afin d'améliorer le pronostic des patients du cancer du côlon à l'état métastatique. Les rythmes circadiens et leur effet sur les biomarqueurs tumoraux seront abordés dans la cinquième partie de ce chapitre.

Afin de situer notre contribution, les différentes plateformes de détection existantes dans la littérature pour les biomarqueurs de cancer seront rapportées dans la sixième partie, suite à laquelle, un tableau synthétisera de manière comparative les principales études et caractéristiques des biocapteurs de marqueurs de cancer.

Enfin, nous déterminerons à partir des différents éléments de reconnaissance et des transducteurs une stratégie de détection des nucléosides pour la suite de nos travaux.

I.2. Statistiques du cancer colorectal

I.2.1. Le cancer colorectal dans le monde

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus répandu et la quatrième cause de mortalité liée au cancer dans le monde entraînant 610.000 décès en 2008 comme le montrent

respectivement les figures 1 et 2. Pour cette même année, le nombre de personnes diagnostiquées atteintes du cancer colorectal à travers le monde était estimé à 1.24 million, sachant que l'incidence du cancer colorectal est nettement plus élevée chez les hommes par rapport aux femmes.

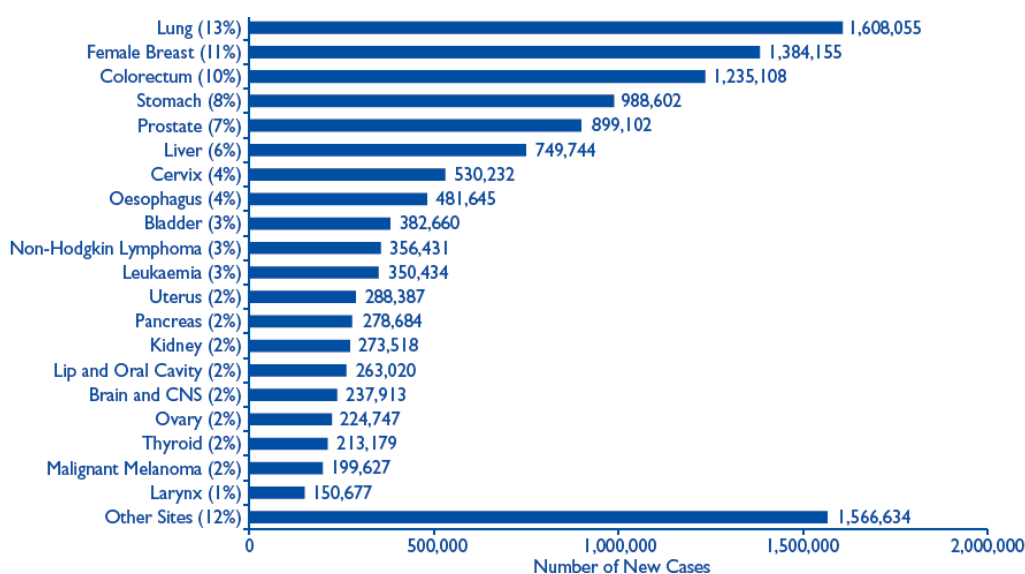


Figure I. 1 Les vingt cancers les plus répandus dans le monde, estimations de 2008

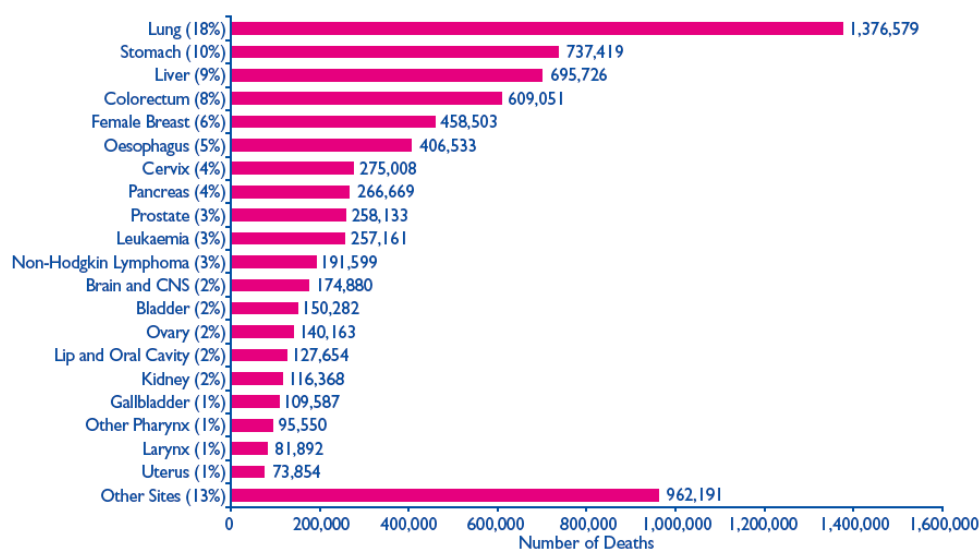


Figure I. 2 Les vingt cancers les plus mortels à travers le monde, estimations de 2008

La variation géographique d'incidence est significative à travers le monde, ce qui peut être attribué à une différence du régime alimentaire et plus particulièrement à la consommation des viandes rouges, des fibres, de l'alcool ainsi qu'au poids et à l'activité physique. Les taux d'incidence du cancer colorectal connaissent une croissance dans des pays où les taux étaient précédemment bas (spécialement au Japon et d'autres pays asiatiques), cela peut s'expliquer par le régime alimentaire qui devient de plus en plus industrialisé. Ces taux ont tendance à se

stabiliser en Europe et à baisser en Amérique du nord. En 2008, 60% des cas étaient diagnostiqués dans les pays développés (INCa, 2011).

I.2.2. Le cancer colorectal en France

La France fait partie des pays ayant une incidence élevée du cancer côlon-rectum. Le vieillissement de la population, l'amélioration des techniques de dépistage, mais aussi des modifications du mode de vie ont probablement favorisé une augmentation de l'incidence à partir des années 80. En 2011, Avec environ 40 500 nouveaux cas, dont 53 % survenant chez l'homme, le cancer du côlon-rectum se situe, tous sexes confondus, au troisième rang des cancers les plus fréquents après le cancer de la prostate (71 000 nouveaux cas) et le cancer du sein (53 000). Chez l'homme, le cancer du côlon-rectum se situe au troisième rang des cancers incidents loin derrière le cancer de la prostate. Il représente 10,4 % de l'ensemble des cancers incidents masculins. Chez la femme, il se situe au deuxième rang derrière le cancer du sein. Il représente 12,0 % de l'ensemble des cancers incidents féminins.

La majorité des nouveaux cas de cancer du côlon-rectum estimés en 2011 surviennent chez les personnes âgées de 50 ans et plus. Avant 50 ans, les taux d'incidence sont faibles et proches entre les deux sexes puis les taux augmentent avec l'âge, plus rapidement chez l'homme que chez la femme (INCa, 2011).

L'évolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du côlon-rectum au cours des dernières années est la même pour les deux sexes, à savoir une tendance à la stabilisation de l'incidence dans les années récentes et une baisse de la mortalité. Cette tendance favorable pour la mortalité par cancer colorectal résulte des progrès réalisés dans la détection de la maladie grâce à un diagnostic plus précoce, à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique et à une diminution de la mortalité opératoire. Il est à noter que le dépistage organisé généralisé depuis une date récente n'a pas pu encore avoir d'impact sur l'évolution de ces taux de mortalité. Dans d'autres pays, tels que les États-Unis ou le Canada, une partie de la baisse de la mortalité par cancer colorectal est attribuée à la diminution de l'incidence depuis le milieu des années 80. Cette tendance n'est pas constatée en France pour l'instant, mais la stabilisation récente de l'augmentation de l'incidence de ce cancer peut indiquer qu'une tendance similaire sera observée en France dans le futur.

I.3. Outils de diagnostic actuels du cancer colorectal

I.3.1. Détection précoce et dépistage

Un diagnostic précoce du cancer permet d'optimiser sa prise en charge et d'améliorer son efficacité. Deux actions permettent ce diagnostic précoce. La première concerne la détection précoce qui s'appuie sur la recherche et l'identification de signes cliniques ou de symptômes suggestifs de cancer. Ces signes sont appelés signes d'alerte. La deuxième action concerne le dépistage qui a pour objectif de mettre en évidence la présence d'un cancer en absence de signe clinique. Par rapport à l'histoire naturelle du cancer, il intervient en amont de la détection précoce. Le dépistage et la détection précoce s'adressent à une population a priori bien portante, ciblée sur un critère de risque de cancer. Ils correspondent à la prévention secondaire du cancer.

I.3.1.1. Programme national du dépistage du cancer colorectal : Un choix de santé publique

En l'absence de symptômes, il est établi qu'en faisant un test de recherche de sang occulte dans les selles tous les 2 ans entre 50 et 74 ans, suivi d'une coloscopie en cas de positivité, il est possible de diminuer de 15 % à 20 % la mortalité par cancer colorectal si la participation de la population atteint 50 %. Ces résultats ont été corroborés en France par une étude menée en Bourgogne auprès de 91 200 personnes, âgées de 45 à 74 ans invitées à faire un test de dépistage tous les 2 ans et suivies pendant 11 ans. La mortalité par cancer colorectal s'est contractée de 33 % chez les personnes ayant fait au moins une fois le test de dépistage. En France, un programme de dépistage organisé a été initié par les pouvoirs publics en 2002. Ainsi, sur l'ensemble du territoire, les structures invitent, par courrier, les hommes et les femmes âgées de 50 à 74 ans, à consulter leur médecin traitant. Il appartient à celui-ci d'évaluer leur état de santé et de leur remettre un test s'ils sont éligibles au dépistage organisé.

I.3.1.2. Une stratégie en deux temps

Le programme de dépistage organisé s'appuie aujourd'hui sur une stratégie en deux temps pour la population à risque moyen de cancer colorectal : le test de recherche de sang occulte dans les selles et s'il s'avère positif, la réalisation d'une coloscopie.

- **Premier temps : le test au gaïac**

Le test au gaïac consiste à prélever deux fois, sur trois selles consécutives, un petit fragment de selles de la taille d'une lentille ou d'un grain de riz qu'il faut déposer sur une plaquette. Cette plaquette est ensuite envoyée à un centre de lecture qui transmet les résultats à la personne et à son médecin traitant afin de permettre la poursuite de la procédure de dépistage, ainsi qu'à la structure départementale en vue de l'évaluation du programme. Le test actuellement utilisé dans le cadre du programme national est le test Hemoccult II® illustré dans la Figure I. 3.

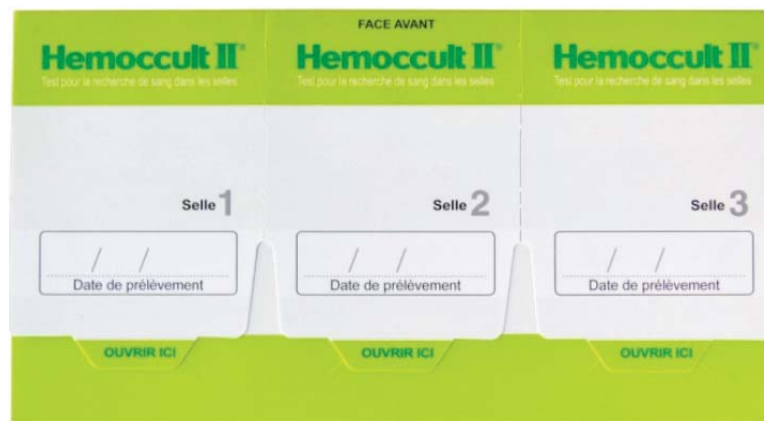


Figure I. 3 Le test Hemoccult II®

En cas de test négatif (97 % des cas), la personne est invitée à renouveler le test deux ans plus tard. Elle est également sensibilisée aux signes d'alerte qui doivent la conduire à consulter son médecin traitant sans attendre ce délai de 2 ans.

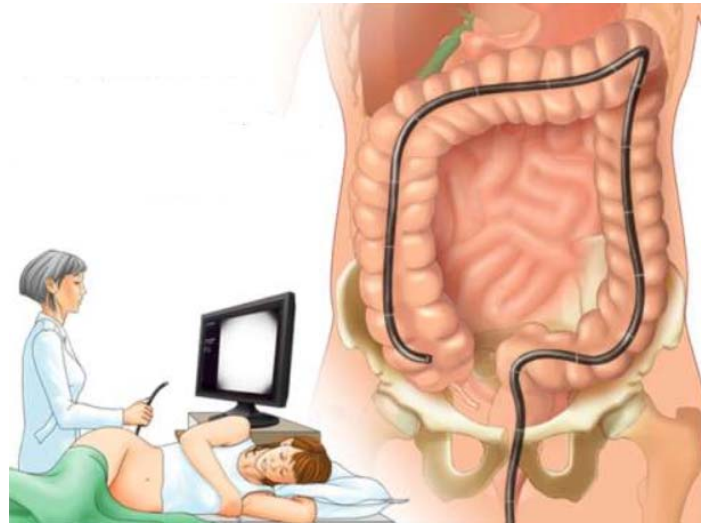
- **Deuxième temps en cas de positivité du test : la coloscopie**

Si le test est positif (3 % des cas), le médecin traitant prescrit une coloscopie pour rechercher la présence de lésions dans le côlon ou le rectum. Cette coloscopie est effectuée par un gastroentérologue comme l'illustre la <http://www.geniialesolutions.com/gastroenterology-endoscopy/colonoscopy/>

Figure I. 4.

La sensibilité du test par coloscopie est de 50 %, ce qui correspond au diagnostic d'un cancer sur deux. Sa spécificité est de 98 %, soit une positivité erronée dans 2 % des cas. Ses caractéristiques intrinsèques permettent de sélectionner au mieux la population et de limiter le nombre de coloscopies inutiles. La coloscopie est actuellement l'examen de référence pour mettre en évidence d'éventuelles anomalies du côlon ou du rectum. Elle permet en outre de

retirer les polypes. Si elles restent rares, les complications liées à la coloscopie ne doivent pas être ignorées et justifient la stratégie en deux temps pour les sujets à risque moyen. Outre les risques inhérents à l'anesthésie, les principales complications sont la perforation et l'hémorragie digestives survenant une à deux fois toutes les 1 000 coloscopies.



<http://www.genüalesolutions.com/gastroenterology-endoscopy/colonoscopy/>

Figure I. 4 Coloscopie avec contrôle de l'image.

I.3.2. Une nouvelle génération de tests : les tests immunologiques

Le test actuel de recherche de sang occulte dans les selles (test au gaïac) devrait évoluer à court terme vers un test immunologique. Ces tests reposent sur la détection de la présence d'hémoglobine (Hb) humaine dans les selles grâce à l'utilisation d'anticorps (Ac), spécifiques de la partie globine de l'hémoglobine humaine. Le résultat de cette mesure est exprimé sous une forme quantitative qui permet d'évaluer la concentration en hémoglobine des selles analysées. Les trois principaux tests immunologiques à lecture automatisée (OC SENSOR® d'Eiken, FOB GOLD® de Beckman Coulter et MAGSTREAM® de Fujirebio) sont actuellement évalués en termes de performance et de stabilité. Les résultats de ces études montrent une supériorité des performances des tests immunologiques à celles du test au gaïac.

I.3.3. Le Coloscanner ou la coloscopie sans douleur

Aujourd'hui, les scanners les plus récents permettent de réaliser de nouveaux examens comme celui du colon (coloscanner). Le coloscanner est l'exploration du colon (gros intestin) que l'on appelle aussi «coloscopie virtuelle». Les récents progrès lui donnent aujourd'hui une sensibilité identique à celle de la coloscopie effectuée par les gastroentérologues, particulièrement dans la détection des polypes du colon. L'examen est sans douleur et de courte durée puisqu'il ne faut que 5 minutes pour le réaliser. L'interprétation est plus longue et, avec le traitement informatique des images, dure au moins 30 minutes. Comme la coloscopie, le coloscanner permet de détecter entre 85 et 90% des polypes de 6 mm ou plus. Une double lecture systématique par un deuxième radiologue permet d'éliminer le maximum de « faux négatifs ». A la différence de la coloscopie, le coloscanner se fait sans hospitalisation et sans anesthésie, son coût est 4 fois moindre. Par ailleurs, il produit une irradiation et ne permet pas de faire un prélèvement pour connaître la dangerosité du ou des polypes ni de les enlever.

I.3.4. La génétique moléculaire des cancers

Les plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers ont pour vocation de réaliser les tests moléculaires innovants. Leur activité concerne en particulier les marqueurs prédictifs déterminant l'accès à une thérapie ciblée ; les marqueurs orientant le processus diagnostique ; les marqueurs participant au diagnostic, en complémentarité de paramètres cliniques, morphologiques, biologiques ; les marqueurs pronostiques orientant la stratégie de traitement du patient ; les marqueurs permettant le suivi de la maladie résiduelle. Les plateformes permettent plus particulièrement un accès optimisé aux thérapies ciblées. En effet, la mise en évidence d'altérations moléculaires dans les cellules cancéreuses a permis, en décrivant mieux la maladie, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, puis de développer des thérapies ciblées contre celles-ci. La Figure I. 5 illustre les types de biomarqueurs et leurs champs d'application.

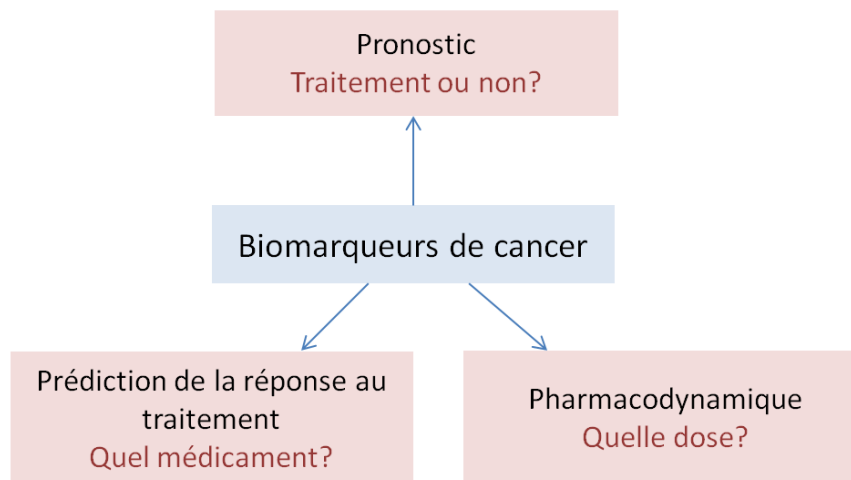


Figure I. 5 Les types de biomarqueurs et leurs champs d'application

Par ailleurs, la mise en évidence d'autres altérations moléculaires permet d'expliquer la résistance de certains patients à des thérapies ciblées, malgré la présence de la cible dans leur tumeur. La mutation de KRAS (code pour la protéine K-ras) permettant de prédire la non-réponse à panitumumab et cetuximab dans le cancer colorectal en est un exemple. La caractérisation moléculaire de la tumeur devient ainsi un critère déterminant dans le choix de la stratégie thérapeutique, qui ne repose plus seulement sur le type et le stade de la maladie. Elle permet un accès optimal aux thérapies ciblées : pour prescrire un traitement aux seuls patients susceptibles d'en bénéficier, pour ne pas prescrire un traitement inutile, toxique et coûteux (I-E. Tothill, 2009).

I.4. Les biomarqueurs du cancer : une technique de diagnostic non invasive

La détection précoce du cancer est cruciale pour la survie des patients et le succès du pronostic de la maladie ; c'est pourquoi des méthodes spécifiques et sensibles sont requises pour le diagnostic précoce du cancer. Les outils existants de dépistage du cancer s'appuient sur des méthodes basées sur la morphologie cellulaire en utilisant la coloration pathologique et la microscopie. Celles-ci représentent des méthodes invasives qui consistent à prélever un échantillon pour la biopsie et à examiner par la suite les tissus pour identifier et détecter les cellules cancéreuses. Ces tests ne sont toutefois pas très concluants individuellement car le prélèvement des tissus peut passer à côté des cellules cancéreuses dans les premiers stades de l'apparition de la maladie c'est ainsi que des recherches plus poussées sont développées pour identifier la malignité du cancer sans avoir recours à des outils invasifs.

L'analyse des biomarqueurs dans le sang, les urines et autres fluides corporels est l'une des méthodes appliquées pour la détection de la maladie. Les profils multi-marqueurs (présence et niveau de concentration) peuvent être essentiels pour le diagnostic précoce de l'apparition de la maladie. Ces méthodes fournissent des informations qui assistent les cliniciens pour faire le bon choix de traitement et augmenter le taux de survie des patients. Les techniques les plus récentes utilisées dans les laboratoires d'hôpitaux sont les tests immunologiques comme le test ELISA pour détecter les biomarqueurs de cancer. Dans la plupart des cas, un seul biomarqueur est identifié comme indicateur de la maladie. Ces tests immunologiques sont très sensibles et sélectifs mais nécessitent beaucoup de temps et sont coûteux. De plus, quelques tests ELISA ne sont pas suffisamment sensibles pour la détection de faibles concentrations de biomarqueurs lors des premiers stades de développement du cancer. L'utilisation d'outils moléculaires (génomique et protéomique) pour créer des signatures moléculaires de la maladie a été récemment introduite. Ces techniques fournissent des données qui sont également essentielles pour la compréhension de la maladie mais elles sont complexes et requièrent un traitement de données et un accès à des informations concernant les patients. Une plateforme technologique plus rapide est ainsi nécessaire pour assurer les besoins de diagnostic rapide du cancer. Un diagnostic rapide va ainsi aider à améliorer l'état de santé et réduire le temps d'attente des résultats qui peut être un grand facteur de stress pour les patients (I-E. Tothill, 2009).

En termes de diagnostic, il est difficile de sélectionner un biomarqueur spécifique à un cancer. C'est pour cela qu'un panel de biomarqueurs potentiels est généralement favorisé (SA. Soper *et al.*, 2006). Des méthodes moléculaires émergentes sont actuellement utilisées pour étudier le cancer et conduire à une meilleure compréhension de cette maladie ainsi que la découverte de nouveaux biomarqueurs génomiques et protéomiques. Des dispositifs au chevet même de chaque patient, *Point of care* (POC) permettant une analyse de plusieurs molécules cibles sont nécessaires pour relever les défis du diagnostic du cancer (C. Ahn *et al.*, 2004). A ce jour, la recherche dans ce domaine connaît une expansion rapide et un grand nombre de nouvelles technologies se développent sur l'arène du diagnostic. Une variété de plateformes de biodétection est reportée dans la littérature pour le diagnostic du cancer. Toutefois, l'évolution de ces technologies vers des produits commerciaux requiert du temps et de l'investissement. Dans ce qui suit, différents marqueurs et les plateformes de détection disponibles pour le diagnostic, le pronostic du cancer et la surveillance de la récurrence de la maladie sous forme de POC, sont présentés.

I.4.1. Les biomarqueurs de cancer dans les fluides corporels

Les antigènes associés aux tumeurs ont été utilisés comme biomarqueurs pour le diagnostic. Ceux-ci comprennent les molécules se trouvant dans les cellules tumorales, le sang, les urines ou autres fluides corporels qui s'expriment de manière plus importante dès l'apparition et lors du développement de la maladie. A ce jour, il y a une multitude de biomarqueurs qui ont été identifiés pour différents types de cancers. Ceux-ci comprennent les modifications d'ADN, l'ARN, les protéines, les hormones, les molécules du système immunitaire, oncogènes et d'autres molécules modifiées. Les avancées dans le domaine de la protéomique et la génomique ont permis de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs. Les technologies d'analyses sérologiques des bibliothèques d'expression de l'ADN (SEREX) aussi bien que celles de l'analyse du protéome sérologique (SEPPA) représentent des stratégies de choix pour identifier les antigènes associés aux tumeurs (CG. Gunawardana *et al.*, 2007). Par exemple, les cancers héréditaires comme le cancer colorectal montrent une mutation du gène FAP ou du HNPCC.

Les biomarqueurs identifiés comme étant fiables pour le diagnostic et le pronostic de la maladie sont répertoriés dans plusieurs bases de données comme le *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI), Cancer Research UK (Cancer Research UK, 2008) et la littérature (SA. Soper *et al.*, 2006) (J. Wu, Z. Fu *et al.*, 2007) (J. Wu, Z. Zhang *et al.*, 2007). Le Tableau I. 1 montre une liste de quelques biomarqueurs associés à différents cancers.

Tableau I. 1 Les biomarqueurs associés au pronostic et au diagnostic de différents cancers

Le type de cancer	Les biomarqueurs associés
Prostate	PSA, PAP
Sein	CA15-3, CA125, CA27.29, CEABRCA1, BRCA2, MUC-1, CEA, NY-BR-1, ING-1
Leucémie	Anormalités des chromosomes
Testicules	α -Fetoprotein (AFP), β -HCG, CAGE-1, ESO-1
Ovaires	CA125, AFP, hCG, p53, CEA
Colon et pancréas	CEA, CA19-9, CA24-2, p53

Le type de cancer	Les biomarqueurs associés
Poumon	NY-ESO-1, CEA, CA19-9, SCC, CYFRA21-1, NSE
Mélanome	Tyrosinase, NY-ESO-1
Foie	AFP, CEA, SCCA
Carcinome gastrique	CA72-4, CEA, CA19-9
Carcinome œsophagien	SCC
Vessie	BAT, FDP, NMP22, HA-Hase, BLCA-4, CYFRA 21-1
Bouche	La protéine Interleukin-8 (IL-8)

Les marqueurs peuvent être utilisés pour le diagnostic précoce, le suivi de la maladie et le pronostic, ils peuvent également servir de marqueurs prédictifs (M. Sanchez-Carbayo, 2004).

Les biomarqueurs peuvent être extracellulaires mais ils peuvent également être présents au sein même des cellules, dans ce cas de figure, ils ont besoin d'être collectés et préconcentrés (si leur concentration est très faible). Des méthodes de préconcentration pour sélectionner des cellules tumorales ont été reportées, celles-ci comprennent la séparation immunomagnétique en utilisant des billes magnétiques (HC. Hu, *et al.*, 2003) (V. Zieglschmid, *et al.*, 2005), et la centrifugation (V. Choesmel, *et al.*, 2004). Quelques biomarqueurs ainsi que leurs seuils de présence dans le sérum humain sont listés dans le Tableau I. 2.

Tableau I. 2 Les seuils de présence dans le sérum humain de quelques biomarqueurs de tumeur (I.E. Tothil et al. 2009).

Biomarqueur	Seuil de présence
NSE	12.5 mg l ⁻¹
PSA	4 µg l ⁻¹
GST	3.2 UI ⁻¹

Biomarqueur	Seuil de présence
CT	100 ng l ⁻¹
SCCA	1.5 µg l ⁻¹
Ferritin	250 µg l ⁻¹
hCG	5.0 UI l ⁻¹
AFP	10 µg l ⁻¹
CEA	3 µg l ⁻¹
CA125	35 KUI l ⁻¹
CA153	25 KUI l ⁻¹
CA27-29	36.4 KUI l ⁻¹
CA549	11 KUI l ⁻¹
CA19-9	37 KUI l ⁻¹
CA50	14-20 KUI l ⁻¹
CA242	20 KUI l ⁻¹
CA72-4	6 KUI l ⁻¹

Les protéines, dont les taux de présence dépassent les seuils en raison de la présence d'un cancer, ont été employées comme biomarqueurs pour le diagnostic. On peut citer comme exemple le biomarqueur *Prostate Specific Antigen* (PSA), responsable de la liquéfaction du liquide séminal et qui est présent dans le sérum des patients masculins du cancer de la prostate (JN. Eble, *et al.*, 2004) (A. J. Vickers et al. 2013). Malgré la sensibilité de ce biomarqueur sa sélectivité est très faible d'où la nécessité d'un diagnostic multi-marqueurs qui peut aider à augmenter la spécificité des dispositifs POCs utilisés pour la détection du cancer de la prostate.

Les outils moléculaires (génomiques et protéomiques) comme la méthode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) et le séquençage ADN, sont utilisés pour la découverte de nouveaux

biomarqueurs. Les tests Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) pour l'analyse de gènes cancéreux sont de plus en plus utilisés afin de prédire le risque de cancer auprès des patients (S. Paik, *et al.*, 2004).

Des analyses séquentielles à grande échelle ont identifié des gènes mutés récurrents et de nombreuses investigations ont mis en évidence de nombreux gènes impliqués dans l'initiation et la progression du cancer colorectal. Ceux-ci comprennent le WNT, RAS2MAPK, PI3K, TGF- β et le P53. En dépit de ces connaissances, les chercheurs n'avaient pas à leur disposition une vision complète des changements génomiques et génétiques et leur signification pour la tumorigénèse du cancer colorectal. Le projet Cancer génome Atlas visait à dresser un profil de ces changements génomiques pour vingt différents cancers dont le cancer colorectal. Ces profils permettraient une compréhension plus approfondie de la pathophysiologie du CRC et pourraient permettre d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques (R. Kucherlapati *et al.*, 2012).

I.4.2. Les nucléosides urinaires comme biomarqueurs de cancer

Les nucléosides modifiés présents dans les urines représentent un cas particulier des biomarqueurs de cancer présents dans les fluides corporels. Dans le cadre du projet ANR qui finance cette thèse, des nucléosides modifiés ont été identifiés comme biomarqueurs pour le contrôle de la thérapie du cancer. En effet, les modifications des niveaux de marqueurs tumoraux peuvent refléter l'effet du traitement. Il est aussi bien connu que le niveau des marqueurs tumoraux change suivant le rythme circadien. Les scientifiques sont ainsi toujours à la recherche de nouveaux et meilleurs biomarqueurs pour remplacer les protéines. Des études récentes sur les changements des acides nucléiques (ADN ou ARN) ou génomique ont été consacrées à la découverte de nouveaux marqueurs tumoraux. Celles-ci ont démontré que les patients du cancer excrètent dans leurs urines davantage de nucléosides modifiés qui dérivent du tARN. Les nucléosides modifiés sont formés par la modification chimique des nucléosides normaux dans l'ARN. Ils ne peuvent pas être réutilisés ni dégradés par le corps et sont excrétés dans les urines en tant que molécules intactes.

Les nucléosides modifiés appartiennent à la famille des robosyl nucléosides ; 20 d'entre eux environ ont été déjà utilisés comme marqueurs tumoraux pour le cancer du sein, du colon et du foie. A titre d'exemple de nucléosides modifiés on peut citer : la Pseudouridine (Psi), 1-méthyladenosine (m1A), 1-méthylguanosine (m1G), 2-méthylguanosine (m2G), 1-

methylinosine (m1I), 2-pyridone-5-carboxamide-N1-ribofuranoside (PCNR). La Figure I. 6 représente les structures chimiques de quelques nucléosides.

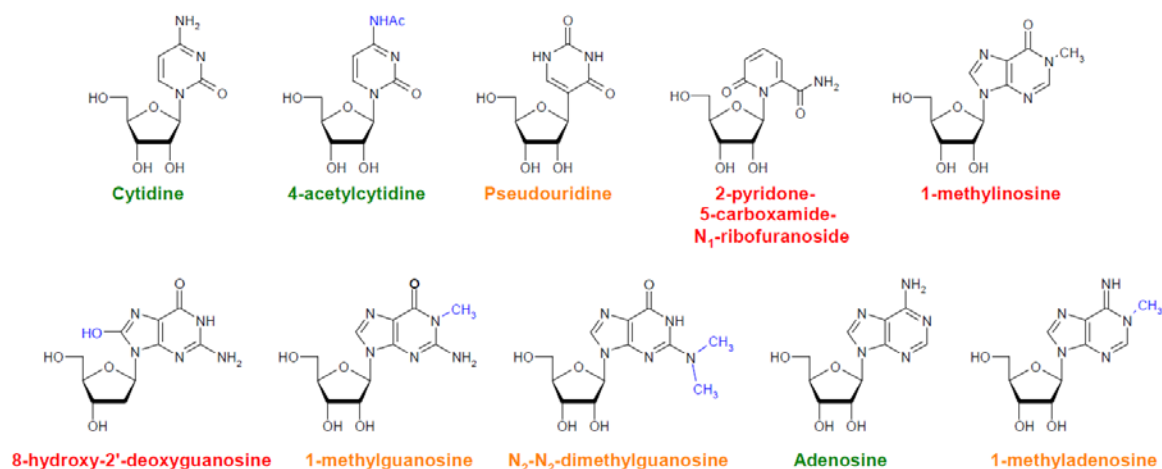


Figure I. 6 Les nucléosides urinaires les plus communs considérés comme des biomarqueurs de cancer (verts : disponibles dans le commerce, oranges : difficiles à commander, rouges : non disponibles dans le commerce)

Le taux de nucléosides est estimé à 10 ng/mL dans le sérum et s'exprime en nmol/ μ mol dans les urines. Pour ce projet nous retiendrons les nucléosides présents dans les urines, dont la détection reste complexe en raison de leur faible niveau et de la complexité du milieu. Le Tableau I. 3 résume des données de la littérature concernant l'augmentation du niveau de nucléosides dans les urines corrélée à différentes tumeurs. Le capteur que nous allons développer par la suite va cibler les nucléosides mis en évidence pour le cancer colorectal.

Tableau I. 3 Les nucléosides dont le niveau augmente en présence de tumeur (L. Agrofoglio et al. 2010), (Feng et al., 2005), (Touitou et al., 1996), (Yang et al., 2002), (Bullinger et al. 2008), (Hsu et al., 2009), (Thomale et al. 1984)

	Cancer du côlon	Cancer du sein	Lymphome chez les souris	Autres cancers
Pseudouridine	+++	+	+++	+++
Cytidine	++	++	ND	+++
1-methyladenosine	+++	+	+++	++
PCNR	ND	ND	ND	+++
N2, N2- dimethylguanosine	+++	ND	+++	+++
1,7-dimethylguanosine	ND	ND	ND	+

6-methyladenosine	ND	ND	ND	+
Adenosine	+++	+++	ND	ND
Inosine	ND	+++	ND	ND
1-methylinosine	+++	++	+++	ND
1-methylguanosine	+++	++	ND	+
2-methylguanosine	ND	++	ND	+
8-hydroxy-2'- deoxyguanosine	+++	ND	ND	ND
4-Acetylcytidine	+++	ND	+	ND

I.4.3. Les biomarqueurs volatils

Une nouvelle catégorie de biomarqueurs de cancer inclue également le suivi de composants volatils dans le sang et les urines comme indicateurs de maladie. Ces recherches sont encore à leurs premiers stades et les biomarqueurs volatils associés à des cancers sont encore limités. On peut citer comme exemple l'utilisation d'alcane, d'alcane méthyle comme marqueurs de stress, ceux-ci ont exhibé une spécificité pour le diagnostic du cancer du sein (M. Phillips, *et al.*, 2003).

Chez l'humain, l'air expiré présente une source potentielle de biomarqueurs de cancer. Quelques analyses de l'air expiré ont démontré des sensibilités de 90% et des spécificités de 80% en utilisant un groupe de biomarqueurs volatils afin de différencier des patients atteints de cancer des patients sains. Pour que l'analyse des biomarqueurs volatils devienne une méthode de diagnostic du cancer il est nécessaire d'établir et de valider des protocoles systématiques et des technologies standardisées. Dans la littérature et depuis les années 1900 plus de deux mille études ont été publiées en rapport avec l'analyse des composants volatils et les méthodes de diagnostic de l'air expiré ; une partie de ces études concernait l'analyse des biomarqueurs de cancer. La spectrométrie de masse et la chromatographie restent les méthodes les mieux adaptées pour l'analyse de l'air expiré. Les composés volatils détectables possédant une utilité potentielle pour le diagnostic comprennent les petites molécules gazeuses, les composés organiques volatils, les protéines et l'ADN. Des cancers ont été étudiés précédemment en utilisant l'analyse chimique de l'air expiré comme le cancer du sein, du colon, du foie, des poumons, des ovaires et de l'estomac (J.E. Szulejko *et al.* 2010). On peut citer comme exemples les travaux de M. Piqué et D.A. Karlin qui analysaient des molécules gazeuses de méthane et d'hydrogène dans l'air expiré de patients atteints de cancer

du côlon (M. Piqué et al. 1984) (D.A. Karlin et al. 1985) ; E. Hietanen, s'est intéressé à la particule de pentane composant organique volatil pour ce même cancer (E. Hietanen et al. 1994). X. Chen et son équipe ont proposé une méthode de détection non invasive pour le cancer du poumon combinée à un réseau de capteurs à ondes de surfaces et une méthode de reconnaissance d'images. Le souffle du patient traverse un nez électronique avec une micro extraction en phase solide et une colonne capillaire pour la préconcentration et la séparation des composants organiques volatils. Une paire de capteurs SAW sur lesquels est déposée une couche mince de Poly-isobutylene (PIB) est connectée à la sortie du port de la colonne capillaire pour la détection de composés chimiques. Une étude de culture de tissus du cancer du poumon est également proposée pour la validation pathologique. Onze composés organiques volatils considérés comme des biomarqueurs du cancer du poumon ont pu être détectés quantitativement et qualitativement. Ces biomarqueurs, sont utilisés par la suite pour diagnostiquer des patients grâce à ce nez électronique combiné à un réseau de neurones artificiels et une méthode d'imagerie (X. Chen et al., 2005).

Les techniques citées précédemment sont réalisées en laboratoire, sont complexes et requièrent un personnel expérimenté pour conduire les analyses. Ils ne sont par ailleurs pas suffisamment précis pour les applications cliniques (JS. Ross, *et al.* , 2004). C'est pour ces raisons que le développement des biomarqueurs basés sur des protéines a connu une croissance significative ces dernières années. L'utilisation des biocapteurs pour les biomarqueurs basés sur des protéines se présente en tant que technique attractive et peu coûteuse pour le développement des dispositifs POCs.

I.5. Rythmes circadiens :

Les rythmes circadiens représentent des processus d'oscillations physiologiques d'une durée de 24 heures pour la majorité des organismes vivants. Chez l'humain, les rythmes circadiens sont observés dans plusieurs systèmes comme la température interne du corps, les oscillations cellulaires, la sécrétion de cortisol et de mélatonine ainsi que l'éveil. L'horloge interne agit comme un minuteur central autorégulé à une période d'environ 24 heures, celle-ci se trouve dans le noyau suprachiasmatique situé dans la région hypothalamique du cerveau. Des photorécepteurs rétiniens spécialisés alimentent le noyau suprachiasmatique formant ainsi un mécanisme qui synchronise la phase des oscillations au cycle externe de jour et de nuit résultant de la rotation de la terre. Le rythme circadien régule les oscillations pour de

nombreux systèmes physiologiques qui ont des répercussions directes sur la santé (C. Mott, 2011).

Dans le domaine de la chronothérapie, le traitement est délivré selon un protocole temporel bien précis synchronisé aux rythmes circadiens des patients. Nous pouvons citer comme exemple, les infusions de médicaments pour la chimiothérapie du cancer colorectal qui augmentent l'efficacité et réduisent la toxicité du traitement (F. Levi 2002).

Un aspect essentiel des applications basées sur les rythmes circadiens est la mesure précise de la phase circadienne individuelle. Comme le mécanisme circadien interne est inaccessible, son état ne peut être mesuré directement et doit être déduit des observations des effets physiologiques qu'il produit. Plusieurs techniques ont été élaborées afin d'identifier les signaux circadiens, comme les estimations de phase à partir de marqueurs physiologiques (E. Klerman, 1999). Une autre approche consiste à estimer la phase grâce à des corrélations avec les activités d'éveil et de sommeil (A. Rosenwasser, 1997). En plus des mesures directes de rythmes circadiens individuels, des modèles mathématiques décrivant la dynamique de réponse de l'horloge interne ont été développés afin de prédire le comportement de l'horloge interne en réponse à différents scénarios d'expositions à la lumière (M. Jewett, 1999).

I.5.1. La perturbation du rythme circadien lors d'un cancer

Il a été démontré que la croissance des cellules cancéreuses et la réponse à la thérapie dépendent du rythme circadien. En effet, la croissance de la tumeur est due à des perturbations de l'horloge hypothalamique qui sont liées à des dysfonctionnements du contrôle du cycle cellulaire. J. Clairambault a tenté d'établir le lien entre le rythme circadien et le cycle cellulaire afin de comprendre comment la thérapie anticancer doit être développée afin d'induire un recouvrement efficace de ces mécanismes de contrôle cellulaires. Il a conçu un modèle physiologique qui prend en compte la prolifération des cellules, le cycle cellulaire et le rythme circadien qui contrôle ces mécanismes cellulaires (J. Clairambault, 2008).

Chez les patients atteints de cancer, les rythmes circadiens sont perturbés et la qualité du sommeil est extrêmement réduite. Au cours d'une étude réalisée à l'institut du cancer en Allemagne par le groupe de (M. MOSER, 2008), il a été démontré que c'était spécialement le profil circadien qui différencie les sujets sains et les patients de cancer. Les dysfonctionnements des rythmes biologiques peuvent également être constatés au niveau des cellules et des vaisseaux soutenant les tissus cancéreux. Les cellules cancéreuses se divisent plutôt lentement car leur métabolisme est limité et elles ne sont pas connectées à la

circulation. La vascularisation qui rend les tissus cancéreux nocifs est suscitée par la sécrétion d'hormones par quelques cellules cancéreuses. Ces nouveaux vaisseaux qui bourgeonnent à partir des vaisseaux normaux, se développent anormalement et semblent désorganisés et chaotiques en raison de leur croissance rapide. Les cellules du muscle dans le mur vasculaire de ces vaisseaux sont manquants, ceux-ci ne répondent donc pas aux hormones régulant le diamètre des vaisseaux dans le rythme circadien. Comme il n'y a pas de restriction temporelle à la croissance, les cellules cancéreuses se développent plus rapidement que les cellules normales et un profil circadien chaotique de température peut être observé. Les tissus cancéreux semblent différents dans leur rythmes par rapport à ceux du reste du métabolisme. La désynchronisation qui en résulte affaiblit les oscillations circadiennes et entraîne un changement de l'amplitude du profil circadien des patients du cancer. Bartsch et son équipe ont constaté une perturbation de la sécrétion de mélatonine chez des patients du cancer du sein. Cette sécrétion n'était pas synchronisée avec le rythme circadien comparé aux modèles de contrôles synchronisés (Bartsch *et al.*, 1980).

1.5.2. Le suivi et l'adaptation de la chimiothérapie selon le rythme circadien pour le cancer colorectal

Différentes études ont démontré que les marqueurs tumoraux dans les urines ou le plasma peuvent également varier selon le rythme circadien. On peut citer à titre d'exemple les variations d'excrétion des antigènes CEA, CA125 et PSA pour le cancer colorectal, des ovaires et de la prostate respectivement. Cependant, de grandes variations entre chaque individu ont été constatées pour ces marqueurs. En effet, les mécanismes de sécrétion de protéines comme le CEA à partir des cellules cancéreuses sont complexes, et l'interprétation des changements circadiens du taux de CEA pour l'ajustement de la thérapie reste insaisissable. En outre, environ 25% des patients du cancer du côlon métastatique montrent un niveau normal de CEA dans le plasma même en présence d'une charge tumorale massive. Par conséquent, de nouveaux marqueurs pouvant refléter la perturbation du rythme circadien lors de la prolifération du cancer permettraient d'adapter les prestations de traitement selon les dynamiques temporelles de prolifération des cellules cancéreuses pour chaque patient. Deux études séparées réalisées par l'INSERM impliquant 192 et 130 patients atteints de cancer colorectal à l'état métastatique, ont utilisé la perturbation du rythme d'activité et de repos comme biomarqueur du système de coordination circadien central. Une analyse récente a comparé l'administration chronomodulée du 5-FU-leucovorin et de l'oxaliplatine à l'administration conventionnelle de ces mêmes médicaments. Pour 842 patients atteints du

cancer du côlon à l'état métastatique, le traitement chronomodulé a amélioré de manière significative l'efficacité de traitement chez les hommes mais pas auprès des femmes par rapport au traitement conventionnel. Considérées dans leur ensemble, ces données indiquent que la personnalisation de la chronothérapie du cancer peut améliorer de manière significative le pronostic des patients du cancer du côlon à l'état métastatique tout en sachant que les biomarqueurs de cancer pourraient être affinés davantage pour atteindre un tel objectif dans la pratique clinique.

Quelques travaux ont montré la pertinence des rythmes circadiens dans l'excrétion de nucléosides urinaires pour des patients sains par rapport à des patients atteints de cancer. Le rythme circadien, est le sujet de nombreuses recherches et devient un important suppresseur de tumeur. D'où l'intérêt de développer et de valider de nouveaux outils de diagnostic en temps réel pour le suivi non-invasif de l'efficacité d'une chimiothérapie du cancer colorectal.

I.6. Les biocapteurs comme outils de diagnostic pour le cancer

Un biocapteur est un dispositif bioanalytique associant ou intégrant une entité de reconnaissance moléculaire à un transducteur. Les biocapteurs peuvent être considérés comme des dispositifs POCs capables d'analyser des échantillons cliniques chez les patients ou à l'hôpital. Afin de développer des technologies de biodétection appropriées et d'assurer leur spécificité, des marqueurs spécifiques doivent être identifiés. Les biocapteurs représentent des plateformes avancées pour l'analyse de biomarqueurs tout en ayant l'avantage d'être peu coûteux, faciles à utiliser, rapides, robustes et offrant la capacité à tester plusieurs molécules cibles simultanément. Pour le diagnostic d'un cancer, un réseau de capteurs peut en effet être mis à profit pour la détection simultanée de plusieurs marqueurs (capacité de multiplexage). La préparation de l'échantillon est généralement intégrée comme une partie du capteur, ainsi les capteurs de glucose qui contiennent des systèmes microfluidiques et des membranes de séparation pour le traitement des échantillons de sang.

I.6.1. L'élément de reconnaissance moléculaire

Afin de reconnaître les biomarqueurs de cancer de manière spécifique, un matériau de reconnaissance optimal doit être implémenté comme récepteur de la molécule cible lors de la conception d'un biocapteur. Ceci est d'autant plus important pour le diagnostic médical puisque la sensibilité et la spécificité de l'élément sensible jouent un rôle essentiel pour l'efficacité du dispositif de détection. Les anticorps sont les molécules les plus utilisées en

raison de leur spécificité et de leur sensibilité, requises pour la détection de faibles concentrations. Des éléments de reconnaissance moléculaire synthétiques (artificiels) plus récents ont été développés et utilisés pour l'analyse et la détection de molécules cibles, ce type de matériau comprend les nanomatériaux et les polymères à empreintes moléculaires (MIPs), les aptamères, les peptides, les protéines, les peptides synthétiques et les matériaux à base d'oxydes de métaux (IE. Tothill, 2001) (IE. Tothill *et al.* , 2001) (KA. Shaikh *et al.* , 2005) (JR. Collett *et al.* , 2005).

I.6.1.1. Les anticorps

Un anticorps est une protéine, utilisée par le système immunitaire pour la détection et la neutralisation d'antigènes spécifiques de certains virus et bactéries. Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines et sont constitués de plusieurs chaînes moléculaires. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes type B, les plasmocytes, et sont largement utilisés comme agent de capture en biologie, en particulier dans les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (H. Tarbague, 2011). Les anticorps (monoclonaux et polyclonaux) ont été appliqués au traitement du cancer en tant que molécules thérapeutiques ciblant les tumeurs dans le corps, aussi bien que sous forme de tests de diagnostic de biomarqueurs et de cellules cancéreuses (MC. Green *et al.* , 2000).

Une large gamme d'anticorps commerciaux spécifiques à des biomarqueurs de cancer est disponible. De nombreux tests ELISA, ont été développés à base d'anticorps pour le diagnostic de certains cancers. Cependant, l'instabilité des anticorps rend cette approche inappropriée pour le stockage des dispositifs à long terme et limite les applications et la commercialisation. La Figure I. 7 représente la structure générale d'un anticorps.

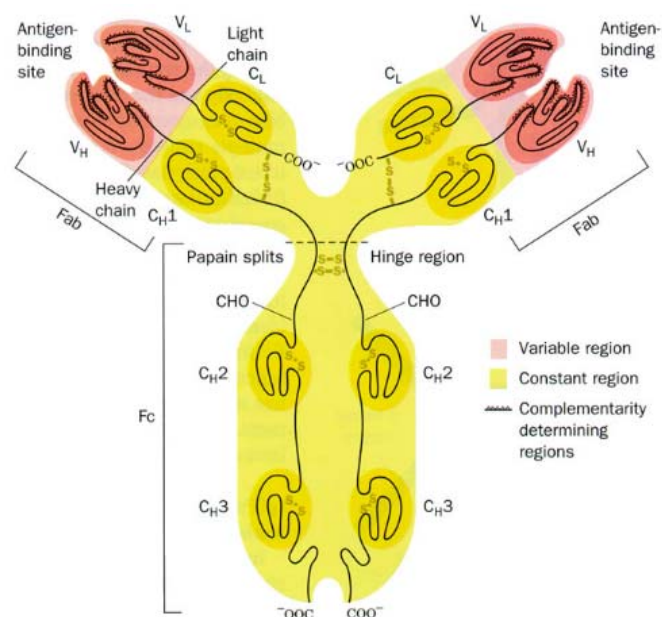


Figure I. 7 Structure générale d'un anticorps (Barbas *et al.* , 1997)

I.6.1.2. Les polymères à empreintes moléculaires

Le remplacement des biomolécules naturelles par des récepteurs artificiels ou biomimétiques est devenu un domaine de recherche très attrayant ces dernières années. Outre leur stabilité et leur coût de production peu élevé, l'avantage de ces molécules réside dans leur facilité de modification chimique pour les immobiliser à la surface des capteurs et incorporer des marqueurs de détection.

L'impression moléculaire a fait l'objet d'intenses recherches durant les quinze dernières années. Par ailleurs, elle est toujours considérée de nos jours dans beaucoup d'applications comme la séparation sélective de matériaux et en tant qu'élément sensible associé à des dispositifs de détection (S. Piletsky, NW. Turner *et al.* , 2006) (S. Piletsky, EV. Piletska *et al.* , 2006).

La reconnaissance de biomarqueurs de cancer par impression moléculaire est un nouveau thème de recherche, un exemple récent concerne le travail de Jégourel *et al* (D. Jégourel *et al.*, 2008), qui a synthétisé un MIP pour l'extraction de la pyrimidine des urines, ce nucléoside étant considéré comme un marqueur de cancer. La modélisation moléculaire a été appliquée pour la sélection des monomères possédant la plus grande affinité, à utiliser lors de la synthèse des MIPs. Des logiciels avec des bibliothèques virtuelles ont été ainsi conçus où sont répertoriées les affinités entre différents monomères fonctionnels et les molécules cibles (I. Chianella *et al.* , 2002) (I. Chianella *et al.* , 2006). Ces logiciels facilitent le calcul en

utilisant les constantes diélectriques qui reflètent la polarité de l'environnement (le solvant) dans lequel le polymère doit être préparé. Les MIPs sont attrayants du fait de leur facilité de préparation, leur grande stabilité thermique et chimique et leur robustesse.

I.6.1.3. Les peptides

L'utilisation des bibliothèques de molécules réceptrices spécifiques a très rapidement été appliquée au diagnostic. Celles-ci visent à identifier des séquences de peptides spécifiques ayant une affinité envers certaines molécules cibles (T. Oyama *et al.* , 2003) (MJ. McGuire *et al.* 2004) (MJ. McGuire *et al.* , 2004). Les bibliothèques de peptides synthétisés sur des billes sont principalement utilisées pour la découverte de nouveaux médicaments, elles ont été par ailleurs plus récemment appliquées à la sélection de ligands récepteurs de nouvelles molécules cibles ; on peut citer comme exemple les peptides capables de reconnaître la molécule $\alpha_6\beta_1$ qui apparaît dans le cancer de la prostate (IB. DeRoock *et al.* , 2001). Les peptides peuvent être synthétisés en grande quantité une fois que le peptide optimal, avec l'affinité requise, a été identifié. Les peptides ont une faible affinité comparés aux anticorps c'est pour cela que les recherches se poursuivent encore dans ce domaine afin d'améliorer cet aspect.

I.6.1.4. Les aptamères

Les aptamères (mot dérivé du mot latin aptus qui signifie ajuster) représentent des ligands d'acides nucléiques synthétiques (ADN ou ARN) sélectionnés de bibliothèques combinatoires d'acides nucléiques synthétiques, qui possèdent une affinité envers une molécule cible particulière comme un biomarqueur de cancer, des médicaments, des protéines et d'autres molécules (CK. O'Sullivan, 2002). Les aptamères (cf. Figure I. 8) utilisés comme récepteur et associés à des capteurs deviennent de plus en plus attrayants pour le diagnostic médical. Cependant malgré la grande affinité qu'ils présentent, ils sont, dans la plupart des cas, moins spécifiques que les anticorps. Une détection de protéine grâce à des aptamères associés à un capteur électrochimique est reporté dans les travaux de M. Rodriguez (M. Rodriguez *et al.* , 2005).



<http://lafontaine.recherche.usherbrooke.ca/recherche.html>

Figure I. 8 Structure d'un aptamère

I.6.2. Le transducteur

Un transducteur est un dispositif qui convertit des phénomènes de reconnaissance en signaux électriques (parfois digitaux). La transduction peut être électrochimique (ampérométrie, potentiométrie, conductimétrie, impédimétrie), optique (colorimétrie, fluorescence, luminescence, interférométrie), calorimétrique (thermistor), mécanique (piézoélectrique / ondes acoustiques) ou magnétique par nature. Même si l'utilisation des transducteurs électrochimiques est très répandue, les capteurs optiques et acoustiques sont devenus populaires par leur utilisation dans des applications concrètes. Cela peut s'expliquer par le fait de voir jusqu'au aujourd'hui utiliser une solution additionnelle au capteur électrochimique pour interpréter les résultats alors que la détection de biomarqueurs se fait de manière directe dans le cas des transducteurs optiques et acoustiques. Plusieurs auteurs ont abordé divers capteurs développés pour le diagnostic de biomarqueurs de cancer (SA. Soper *et al.*, 2006) (J. Wu *et al.*, 2007) (BB. Haab *et al.*, 2005) (I-E. Tothill, 2009).

I.6.2.1. Les transducteurs électrochimiques

Les biocapteurs électrochimiques sont utilisés comme des dispositifs au chevet des patients comme dans les centres de soin puisqu'ils sont portables, simples à utiliser, peu coûteux et jetables dans la plupart des cas. Le capteur de glucose est l'exemple le plus connu des biocapteurs électrochimiques à base d'électrode imprimée ampérométrique jetable. Ce type de biocapteur a été largement utilisé à travers le monde pour le test de glucose à domicile simplifiant ainsi le diagnostic sur site. Un autre développement dans ce même domaine, est l'analyseur portable i.STAT qui combine plusieurs biocapteurs électrochimiques sur une seule

et même puce utilisée pour analyser plusieurs échantillons cliniques. Les capteurs électrochimiques à base d'anticorps offrent une bonne sensibilité et sélectivité pour le diagnostic précoce du cancer. Des revues comme celles de Lin (J. Lin *et al.* , 2005) et Wang (J. Wang *et al.* , 2006) ont examiné l'utilisation des biocapteurs électrochimiques pour le diagnostic du cancer.

Même si la technologie dans ce domaine en est encore au stade de la recherche, les biocapteurs électrochimiques, s'appuyant sur la bioaffinité, ont été appliqués à la détection de mutations de biomarqueurs de cancer. Dans ce type de dispositifs une séquence ADN est immobilisée à la surface de l'électrode, la détection se fait ainsi par plusieurs méthodes, en particulier l'utilisation de l'oxydation de guanine ou la réduction d'enzymes pour générer des changements du signal électrochimique suite à la formation de duplexes d'ADN à la surface de l'électrode. Wang et Kawde ont utilisé la transduction potentiométrique associée à la guanine pour la détection des gènes BRCA1 et BRCA2 liés au cancer du sein (Wang J *et al.* , 2000). Tansil *et al.* ont également présenté une méthode de détection de biomarqueurs de cancer dans les tissus du sein en utilisant une oxydation catalytique de la base nucléique guanine (NC. Tansil *et al.* , 2005).

Les tests ELISA sont très utilisés pour l'analyse des biomarqueurs de cancer. Dans cette technique, l'anticorps ou l'antigène est marqué par une enzyme afin de créer des entités électroactives. Afin de développer des dispositifs pratiques commerciaux, il est nécessaire de mieux contrôler les phénomènes de liaisons entre les anticorps et les antigènes ainsi que les signaux bruités que connaît ce type de transducteur.

I.6.2.2. Les transducteurs optiques

Les transducteurs optiques utilisés dans la biodétection s'appuient sur la fluorescence, l'interférométrie et la spectroscopie de guides d'ondes optiques et de résonance plasmonique de surface *Surface Plasmon Resonance* (SPR). De nombreuses plateformes commerciales utilisent des marqueurs fluorescents pour la détection mais les instruments utilisés pour l'interprétation des signaux sont généralement coûteux et sont plutôt appropriés à l'expérimentation en laboratoire. Nous pouvons citer comme exemple, la puce Affymetrix (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA) utilisée pour l'identification de gènes liés au cancer. D'autres plateformes de biodétection comme les SPRs, les miroirs résonnants et les coupleurs ont également été utilisés pour le diagnostic des biomarqueurs de cancer, ces dispositifs sont considérés en tant que systèmes de détection en temps réel et sans marquage. Les systèmes

SPR comme la puce BiaCore™ (GE Health Care, USA) représentent les transducteurs optiques les plus utilisés comme plateformes de détection de manière générale. Leur utilisation pour la détection de biomarqueurs de cancer est par ailleurs largement répandue. D'autres compagnies ont fabriqué des capteurs SPR comme Texas Instruments et Nippon Laser. De nombreux biocapteurs SPR ont été développés à base des systèmes optiques cités précédemment pour la détection de biomarqueurs de cancer dont quelques-uns sont listés dans le tableau 4. Leur utilisation reste malheureusement limitée aux tests en laboratoire et ne peut être effectuée sur site.

I.6.2.3. Les transducteurs mécaniques

Les capteurs à ondes de volume ont été utilisés pour de nombreuses applications médicales (IB. DeRoock *et al.*, 2001) (XD. Zhou *et al.*, 2002). Les immunocapteurs sont généralement conçus pour détecter des biomarqueurs de cancer grâce à des anticorps greffés à leurs surfaces. Des dispositifs s'appuyant sur cette technologie sont actuellement disponibles sur le marché comme la micro balance à quartz QCMA 1 (Sierra Sensors GmbH, Hamburg, Allemagne) entièrement automatisée. Celle-ci est utilisée à l'université de Cranfield (Royaume Uni, Angleterre) afin de développer un capteur pour la détection de PSA grâce à des anticorps immobilisée sur une surface en or (Y. Uludag *et al.* , 2009). On peut également citer les immunocapteurs piézoélectriques pour la détection de ferritine humaine (SF. Chou *et al.* , 2002) et hCG (B. Zhang *et al.* , 2004).

Les micropoutres ont également été appliquées comme moyen d'analyse des biomarqueurs de cancer. Les interactions entre les biomarqueurs et les anticorps à la surface des micropoutres sont interprétées par la déformation du capteur due à l'effet de masse qui se traduit à son tour par une variation de la fréquence (K.M. Hansen *et al.* , 2005) Le tableau 4 contient également une liste des capteurs à base de transducteurs mécaniques, généralement liés à un effet de masse, parfois à un effet viscoélastique.

I.6.2.4. Les microantennes

Une autre approche pour détecter les interactions antigène-anticorps consiste à utiliser des microantennes planaires comme illustré sur la Figure I. 9. Les antennes sont des dispositifs qui servent à émettre et recevoir des ondes électromagnétiques, où la longueur du chemin de transmission entre une paire d'antennes affecte la force du signal Radio Fréquence (RF). Les microantennes biologiques peuvent être conçues en imprimant un matériau

conducteur par photolithographie et en greffant par la suite des anticorps à cette couche conductrice.

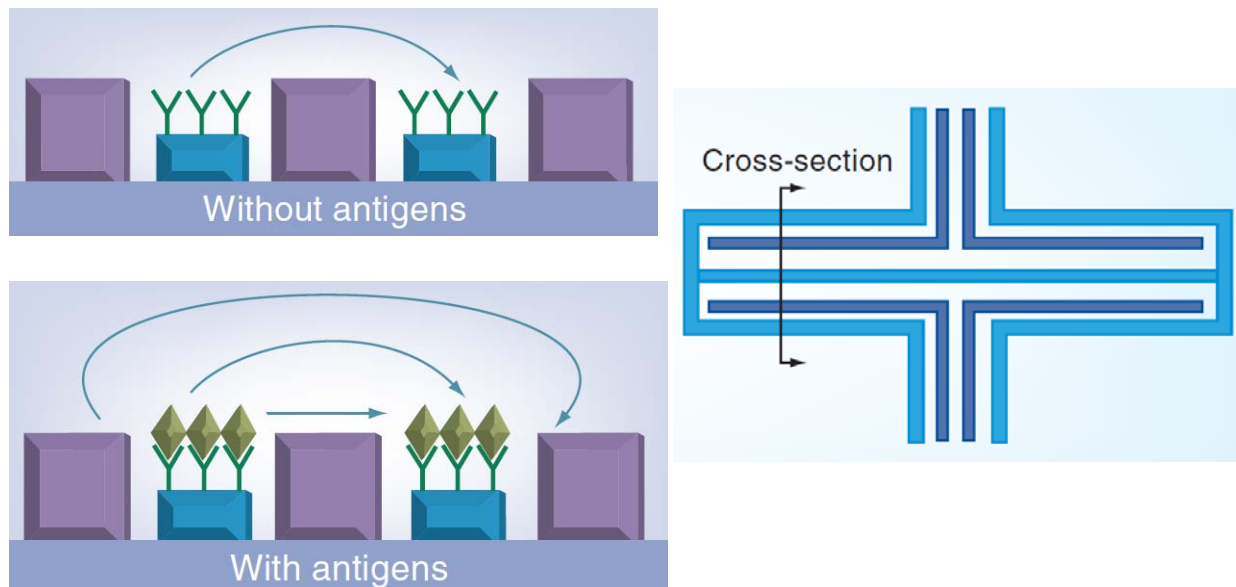


Figure I. 9 L'image de droite représente une vue du dessus d'un capteur microantenne avec une ligne représentant une coupe transversale schématisée à gauche. Des anticorps sont immobilisés à la surface de la région active sur capteur du haut tandis que l'antenne du bas a capturé des antigènes (D. Arruda et al. , 2009).

Lorsqu'un signal RF est appliqué à l'antenne émettrice, un signal mesurable est transmis à l'antenne réceptrice ; la capture des antigènes par les anticorps imprimés sur la microantenne entraînerait un changement du signal par rapport au signal de référence. La conception d'une telle antenne pour la détection nécessite un blindage de l'ensemble pour une meilleure transmission du signal (D. Arruda *et al.* , 2009).

I.6.2.5. Le marquage électromagnétique

Les nanobilles magnétiques sont des nanoparticules, généralement à base d'oxyde de fer, recouvertes d'un polymère biocompatible. Les nanoparticules peuvent être synthétisées en utilisant diverses techniques, pour atteindre des formes d'une taille inférieure à quelques centaines de nanomètres, cette taille est comparable à celle des cellules, des virus, des gènes et des protéines. La surface de ces nanoparticules peut être fonctionnalisée par certains ligands pour capturer de manière sélective des protéines cibles. Dans des applications de détection microélectronique, les nanoparticules magnétiques ont été utilisées pour détecter le biomarqueur du cancer des ovaires CA-125 à de faibles concentrations de l'ordre de (1-10fmol) (JWM. Bulte *et al.* , 2008). Les nanoparticules sont stables dans le sens où elles ne

sont pas affectées par les réactifs chimiques et peuvent être détectées dans un environnement biologique. Dans la présence d'un champ électromagnétique externe, les nanoparticules s'alignent ; lorsque le champ est annulé, un phénomène de relaxation apparait. La magnéto-relaxométrie est une méthode qui peut être utilisée pour détecter ce temps de relaxation qui peut être corrélé à la présence de nanoparticules recouvertes d'anticorps. Un capteur d'impédance magnétique a été utilisé pour détecter la présence de nanoparticules magnétiques attachées à des anticorps et immobilisées à la surface d'un substrat. Un champ électromagnétique externe est appliqué pour polariser les nanoparticules. L'impédance du substrat est affectée par le champ électromagnétique résultant des nanoparticules.

Par ailleurs, il existe d'autres techniques utilisant des nanoparticules pour le tri des entités biologiques en utilisant des systèmes microfluidiques. Cette technologie est prometteuse pour le développement de dispositifs POC.

Le Tableau I. 4 dresse une liste de quelques exemples de capteurs selon le mode de transduction utilisé pour la détection de biomarqueurs de cancer.

Tableau I. 4 Exemples de biocapteurs dédiés à l'analyse des biomarqueurs de cancer

Le marqueur de cancer détecté	Type de transduction	Principe de détection	Seuil de détection	Référence
AFP	Electrochimique	Capteur ampérométrique imprimé modifié par le bleu prussien	(Entre 5–500 ng.ml ⁻¹)	(JG. Guan <i>et al.</i> , 2004)
AFP et CEA	Electrochimique	Détection ampérométrique par anticorps	1ng.ml ⁻¹	(MS. Wilson, 2005)
CA15-3	Electrochimique	Film sol-gel fonctionnalisé par des anticorps avec détection potentiométrique	6×10 ⁷ ng.ml ⁻¹	(RP. Liang <i>et al.</i> , 2004)
CA125	Electrochimique	Electrophorèse capillaire/ enzymes	68,9×10 ⁷ ng.ml ⁻¹	(Z. He <i>et al.</i> 2003)
CA125	Electrochimique	Technique sol-gel sur une électrode	15,5×10 ⁷ ng.ml ⁻¹	(Z. Dai <i>et al.</i> , 2003)
		Détection par l'enzyme peroxydase de raifort		
CA19-9	Electrochimique	Détection ampérométrique par immobilisation d'antigènes à la surface d'une électrode	2.68 U/ml	(D. Du <i>et al.</i> , 2003)
CEA	Electrochimique	Thionine immobilisée en tant qu'élément médiateur entre l'électrode et l'enzyme	(Entre 0.6–17 ng.ml ⁻¹ , 17–200 ng.ml ⁻¹)	(Z.Dai <i>et al.</i> , 2005)
CEA	Electrochimique	Détection par l'enzyme peroxydase de raifort	0.4 ng ml ⁻¹	(F. Tan <i>et al.</i> , 2006)
CEA	Optique	Enzyme	0.5 ng.ml ⁻¹	(JH. Lin <i>et al.</i> , 2004)

CEA	Potentiometrique	Puce en silicium recouverte d'or. Les molécules sont liées chimiquement à la surface du métal et arrangées en monocouches auto assemblées.	(2.5–250 ng.ml ⁻¹) Pas de réactivité croisée	Y. Wang <i>et al.</i> , 2010)
Ferritin	Effet de masse	Immobilisation d'anticorps à la surface d'une micro balance à quartz	(Entre 0.1–100 ng.ml ⁻¹)	(SF. Chou <i>et al.</i> , 2002)
hCG	Optique	Immunocapteur fluorescent	(Entre 0.209–12.57×10 ³ ng.ml ⁻¹)	(N. Nakamura <i>et al.</i> , 2001)
PSA	Electrochimique	Détection ampérométrique par immobilisation d'anticorps à la surface d'une électrode.	10 ng.ml ⁻¹	(P. Sarkar <i>et al.</i> , 2002)
PSA	Electrochimique	Mesure de capacité/ immobilisation d'anticorps	3 ng.ml ⁻¹	(C. Fernandez-Sanchez <i>et al.</i> , 2004)
PSA	Effet de masse	Anticorps immobilisés à la surface d'une micro balance à quartz	0.29 ng.ml ⁻¹	(Y. Uludag <i>et al.</i> , 2009)
PSA	Effet de masse	Anticorps immobilisés à la surface d'une micropoutre	10 ng.ml ⁻¹	(KW. Wee <i>et al.</i> , 2005)
PSA	Effet de masse	Anticorps immobilisés à la surface d'une micropoutre	(Entre 0.2–60×10 ⁹ ng.ml ⁻¹)	(G. Wu <i>et al.</i> , 2001)
PSA	Optique	SPR avec nanoparticules d'or	0.15 ng.ml ⁻¹	(G. Besselink <i>et al.</i> , 2004)
hMAM	Effet de masse	Immobilisation de streptavidine à la surface d'un SAW	1,5 ng.ml ⁻¹	(O. Tigli <i>et al.</i> 2010)
IL-8	Optique	Immobilisation de streptavidine et mesure de fluorescence	4.0 fM	(W. Tana <i>et al.</i> , 2008)
SCCA	Electrochimique	Anticorps	2.43×10 ⁹ ng.ml ⁻¹	(S. Carraraa <i>et al.</i> , 2009)

IgM	Optique	Anticorps	14 ± 3 mV/s pour les points de détection vs 260 µV/s et 242 µV/s pour les points de contrôle	(P. Grossoa <i>et al.</i> , 2010)
bilirubin		Un MIP à base du sol-gel xerogel pour l'extraction du biomarqueur dans le plasma et les urines	Plasma: 365.41×10 ³ ng.ml ⁻¹ Urines: 116.93×10 ³ ng.ml ⁻¹	(M.M. Moein <i>et al.</i> , 2014)
Carnitine (CRT)	Potentiometrique	Un matériau polymère intelligent (SPAM) associé à des électrodes potentiométriques	44.7 x 10 ⁻² ng.ml ⁻¹	(L. Truta <i>et al.</i> , 2014)

I.7. Conclusion

Les chiffres des statistiques du cancer colorectal en France et dans le monde montrent la nécessité de développement de plateformes technologiques plus rapides, sensibles et spécifiques pour assurer le diagnostic du cancer. Un diagnostic rapide va ainsi aider à améliorer l'état de santé et réduire le temps d'attente des résultats qui peut être un grand facteur de stress pour les patients.

Les outils actuels de diagnostic du cancer sont invasifs, coûteux, nécessitent beaucoup de temps et un personnel hospitalier formé, c'est ainsi que des recherches plus poussées sont développées pour identifier la malignité du cancer sans avoir recours à des outils invasifs. L'analyse des biomarqueurs dans le sang, les urines et autres fluides corporels est l'une des méthodes appliquées pour la détection précoce de la maladie. Dans le cadre de ce projet des nucléosides urinaires ont été identifiés comme biomarqueurs pour le cancer colorectal. Quelques travaux ont montré la pertinence des rythmes circadiens dans l'excrétion de nucléosides urinaires pour des patients sains par rapport à des patients atteints de cancer. Par conséquent, ces marqueurs reflétant la perturbation du rythme circadien lors de la prolifération du cancer permettraient d'adapter les prestations de traitement selon les dynamiques temporelles de prolifération des cellules cancéreuses pour chaque patient.

Dans la littérature de nombreuses plateformes de détection de biomarqueurs de cancer existent. Parmi les éléments de reconnaissance de biomarqueurs comme les anticorps, les peptides et les aptamères, les polymères à empreintes moléculaires semblent attrayants du fait de leur facilité de préparation, leur grande stabilité thermique et chimique et leur robustesse. Par ailleurs, différents transducteurs électrochimiques, optiques ont été utilisés pour la reconnaissance de biomarqueurs de cancer dont les transducteurs acoustiques à ondes de surface se démarquent par leur sensibilité en milieu liquide.

L'objectif de nos travaux étant de développer un outil non invasif de diagnostic précoce et de suivi des biomarqueurs du cancer colorectal, notre choix de la stratégie de détection s'est naturellement porté sur les polymères à empreintes moléculaires comme élément de reconnaissance des biomarqueurs. Celui-ci sera associé à un transducteur acoustique à ondes de Love mis au point lors de travaux précédents au sein de l'équipe MDA (N. Moll *et al.*, 2007). Le biocapteur ainsi développé va cibler les nucléosides mis en

évidence pour le cancer colorectal. Les éléments constituant notre biocapteur seront présentés de manière détaillée dans le chapitre suivant.

II. Les polymères à empreintes moléculaires

II.1. Introduction

L'un des moteurs fondamentaux de la chimie est la création de nouveaux matériaux possédant de meilleures propriétés conduisant à des applications ne pouvant pas être réalisées par les matériaux naturels. Dans ce cadre, l'étude de structures naturelles comme modèles pour des matériaux traités technologiquement a pris de plus en plus d'importance. Ceci est reflété parfaitement par la déclaration suivante : « L'inspiration de la nature devrait continuer à orienter les améliorations technologiques et l'impact se fera ressentir dans chaque aspect de nos vies » (B. Cohen, 2006). Cela est dû au fait que la nature a développé un nombre impressionnant de divers matériaux en employant dans les mêmes proportions quelques matières premières simples. Dans la plupart des cas, les matériaux ou structures biologiques sont à base de fibres qui permettent la construction d'architectures fonctionnelles (E.A.C. Johnson *et al.*, 2009). Une autre classe importante de matériaux comprend tous les types de récepteurs et les éléments de reconnaissance. Dans les deux cas, la science des matériaux et la chimie se focalisent davantage sur la génération de matrices artificielles inspirées par la nature, utilisant ainsi l'approche biomimétique.

Dans ce chapitre, l'évolution de l'utilisation des MIPs comme matériaux sélectifs associés aux capteurs piézoélectriques (PZ) pour la détection de petites molécules, à travers les 15 dernières années, est présentée et discutée. Nous soulignerons les caractéristiques analytiques et le potentiel pratique des capteurs piézoélectriques associés aux MIPs qui combinent les avantages de sélectivité des MIPs à la sensibilité de la détection piézoélectrique. Avec une analyse des différents types de détection, nous résumerons les stratégies d'intégration, décrirons les applications des MIPs associés aux capteurs PZ rapportés dans la littérature et montrerons leurs réelles possibilités d'application dans un futur proche.

II.2. Association des polymères à empreintes moléculaires aux capteurs piézoélectriques

II.2.1.Principe de la technique d'impression moléculaire

En général, les stratégies biomimétiques visant la détection d'espèces biologiques peuvent être catégorisées comme suit :

- Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs)
- Les monocouches auto-assemblées (SAMs) “self-assembled monolayers”.
- Les peptides, les enzymes, l'ADN et les récepteurs naturels dans les environnements artificiels
- Les nanoparticules (NPs), les matériaux nanostructurés et les quantum dots (QDs)

L'impression moléculaire représentée en Figure II. 1, consiste à concevoir des récepteurs naturels qui possèdent des fonctionnalités biologiques en dépit de la nature artificielle et synthétique de la matrice dont ils sont constitués. Comme les systèmes biologiques, les liaisons avec les molécules cibles sont établies par des interactions non covalentes mais avec une structure de base complètement différente. Dans le cas des membranes mimétiques, deux différentes stratégies sont actuellement adoptées : la première utilise des polymères artificiels qui repoussent ou attirent les espèces biologiques, constituant ainsi des couches sensibles pour les biocapteurs. Celles-ci sont parfois associées à des matériaux récepteurs/indicateurs naturels pour mettre à profit des interactions spécifiques dans un environnement artificiel et immobiliser ainsi la cible qui nous intéresse. La seconde stratégie a pour objectif d'imiter des membranes de cellules naturelles, e.g. les techniques Langmuir–Blodgett et leur utilisation pour immobiliser des récepteurs (naturels). Par rapport aux polymères, ces techniques sont censées immobiliser les cibles réceptrices dans un environnement assez proche de leur contexte original. Les peptides artificiels, les enzymes ADN, etc. se focalisent sur la partie fonctionnelle d'une biomolécule et reproduisent uniquement cette partie afin de simplifier la synthèse. Les nanoparticules et les nanostructures ne sont pas nécessairement biomimétiques mais leur association à différentes stratégies de détections ouvre la voie à de nouvelles approches de biodétection.

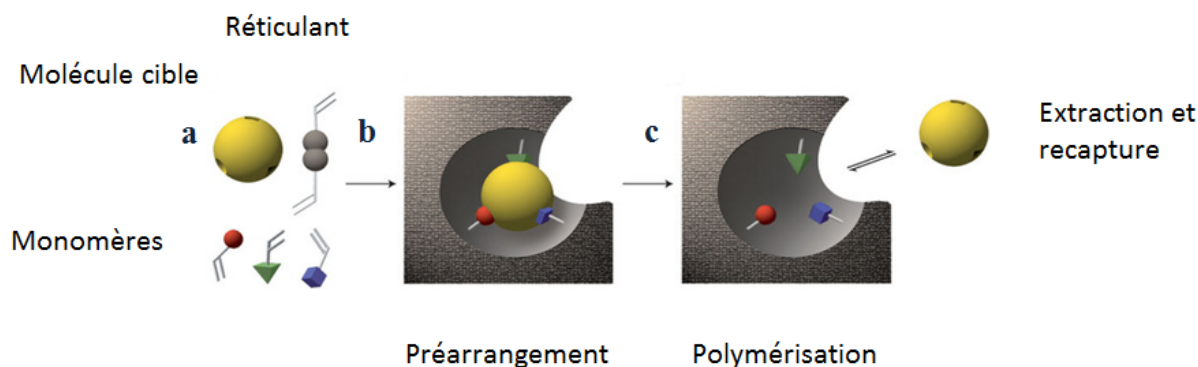


Figure II. 1 Schéma réactionnel de la préparation de MIPs

Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) suscitent un vif intérêt dans le développement des capteurs biomimétiques auprès des chercheurs étant donnés leurs avantages par rapport aux molécules biologiques comme les récepteurs naturels et les enzymes, en termes de stabilité, de cout et de facilité de préparation.

II.2.2. Avantages de l'association des polymères à empreintes moléculaires aux capteurs piézoélectriques

Les capteurs sensibles à l'effet de masse comme les capteurs à onde acoustique de surface (SAW), présentent de nombreux avantages pour la détection d'éléments chimiques. Comme leur nom l'implique, ils réagissent à des changements de masse à la surface de leur zone sensible, ce qui rend leur application universelle puisque la masse est une propriété universelle de la matière. Dans le cas d'une détection chimique, le transducteur assure la sensibilité, il transforme ainsi un signal chimique ou physique en quantité électrique qui va être enregistrée et traitée par la suite. Il fournit par conséquent une information quantitative mais ne fournit pas ou peu d'informations qualitatives puisque les changements de fréquence d'un dispositif nu dépendent de la quantité de physisorption à la surface des électrodes. La sélectivité apparaît alors comme un aspect crucial pour les applications pratiques des capteurs. Plusieurs applications ont été rapportées à cet effet, notamment pour la détection de toxines, de bactérie et de pesticides, d'immunoréactions et d'hybridation ADN (M. Avila *et al.* , 2008).

L'impression moléculaire, où la couche sensible est générée par polymérisation directe à la surface du capteur bénéficie d'une attention accrue (B. Sellergren, 2001) (M. Yan *et al.*, 2004) (M. Komiyama *et al.* , 2003). Le principe consiste à former des cavités complémentaires en forme et en fonctionnalité à la molécule empreinte. Ceci est réalisé lorsqu'un réticulant

enveloppe un complexe pré arrangé formé par les monomères fonctionnels et la molécule empreinte. Après extraction de l'empreinte à partir du polymère, la cavité obtenue est spécifique à la molécule cible. Un polymère non imprimé (NIP) est préparé comme référence afin d'évaluer la formation de l'empreinte moléculaire. La technique de synthèse est simple, peu coûteuse et les polymères obtenus présentent une sélectivité élevée, une résistance mécanique et une durabilité à des expositions à la chaleur, aux acides et aux bases. Ces propriétés permettent aux MIPs d'être utilisés dans divers domaines allant de l'extraction en phase solide (J.L. Urraca *et al.*, 2007), des éléments de détection dans les capteurs (F. Navarro-Villoslada *et al.*, 2007), des anticorps artificiels aux séparations électrophorétiques (M Kempe, 1996).

L'association des MIPs aux capteurs PZ peut s'avérer fort intéressante. La littérature démontre qu'en dépit de la grande quantité d'information concernant la formulation des MIPs, l'application majeure reste le domaine de la séparation ; tant dis que, l'application capteur et plus particulièrement les capteurs PZs avance plus lentement. Les capteurs PZs offrent des seuils de détections très bas, avec la possibilité d'une miniaturisation et d'une automatisation. En dépit de cette pertinence et du nombre important de publications traitant de l'utilisation de ces capteurs pour l'identification et la quantification de différentes molécules dans diverses matrices, peu de revues se sont intéressées au potentiel des capteurs MIPs-PZ. La Figure II. 2 montre le nombre de publications parues chaque année sur la période 2004 à 2015 autour des polymères à empreintes moléculaires tandis que la Figure II. 3 illustre le nombre de publications parues sur cette même période concernant la détection électrochimique, optique et piézoélectrique utilisant la reconnaissance par impression moléculaire.

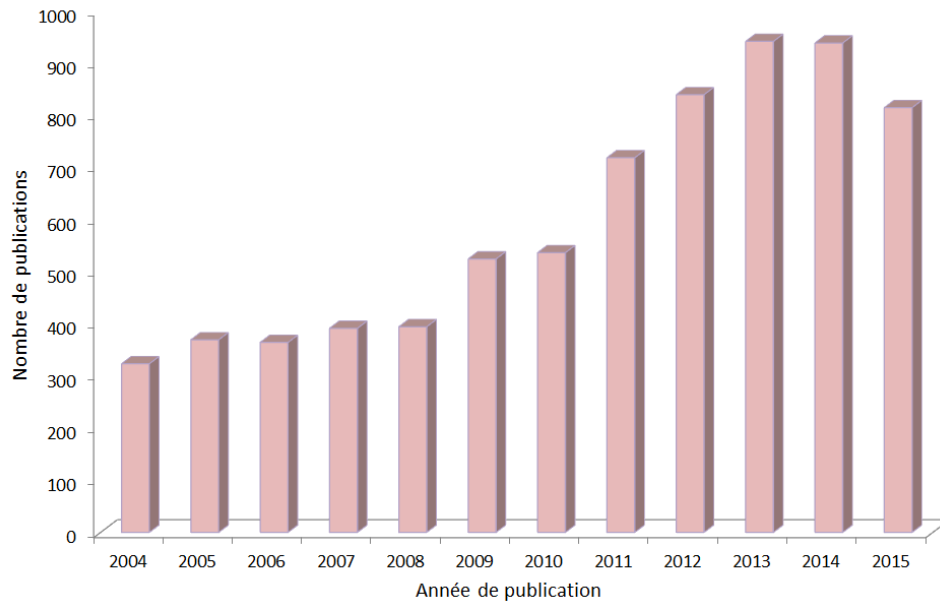


Figure II. 2 Evolution du nombre de publications autour des MIPs de 2004 à 2015 (*Données Mip data base*).

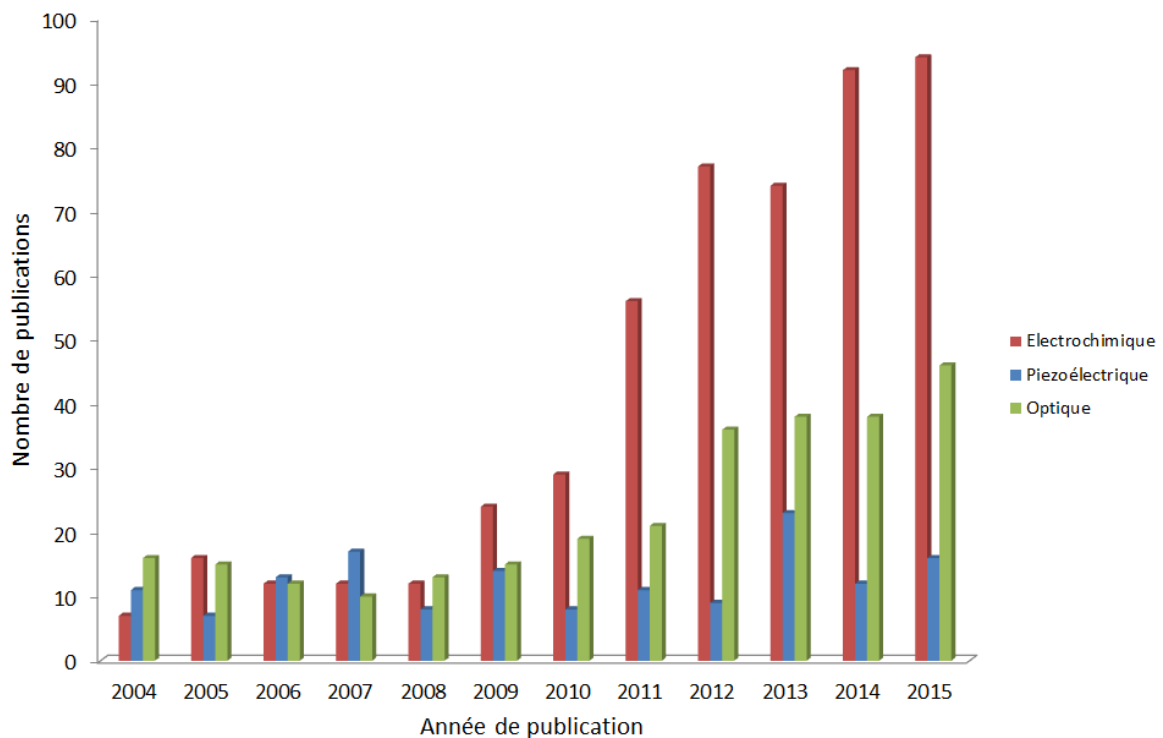


Figure II. 3 Croissance des capteurs piézoélectriques, optiques, électrochimiques à base de MIPs de 2004 à 2015 (*Données Mip data base*).

L'efficacité de recapture des MIPs, le principe de reconnaissance et la sélectivité ont été étudiés avec les capteurs PZs grâce à la sensibilité élevée de ces derniers et leur simplicité d'utilisation. La première contribution rapportée dans la littérature concernant un MIP associé

à un capteur PZ remonte à 1996 (M Kempe, 1996). Les auteurs ont détecté des traces d'hydrocarbures aromatiques et halogénés de l'ordre du ppm dans des conditions ambiantes en utilisant des MIPs comme matériaux sélectifs associés à un résonateur SAW. Depuis, plusieurs éléments de reconnaissance et différents types de transducteurs PZs ont été explorés. Comme on peut le constater sur la Figure II. 2, l'utilisation des capteurs à base de MIP et particulièrement ceux à base de transduction optique et électrochimique a nettement augmenté. Les capteurs MIP-PZ ont été moins utilisés et ont progressé plus lentement avec une moyenne de 13 publications par ans. Les travaux à base de capteurs acoustiques PZ (principalement des Bulk Acoustic Wave (BAW), Thickness Shear Mode (TSM) ou QCM) ayant fait l'objet des travaux publiés ont analysé les spécificités de la recapture, les affinités, la cinétique et les changements de conformation associés aux phénomènes de reconnaissance moléculaire.

II.2.3. Exemples d'association de polymères à empreintes moléculaires à des capteurs piézoélectriques dans la littérature

Dans ce qui suit, quelques exemples de MIPs associés à des capteurs PZ pour la détection de différentes espèces chimiques sont présentés.

A titre d'illustration, la protéine (glycoprotein 41, gp41), liée au virus d'immunodéficience type 1 (HIV-1) a attiré l'attention de la communauté scientifique car cette protéine transmembranaire du virus HIV-1 joue un rôle très important dans l'efficacité de l'intervention thérapeutique en indiquant la progression de la maladie. En implémentant la stratégie d'impression d'épitope (où c'est uniquement une sous-structure de la cible qui est utilisée comme molécule empreinte), Lu *et al.* ont développé un capteur biomimétique pour détecter la gp41. Ils ont utilisé une microbalance à quartz comme élément transducteur et la dopamine comme monomère fonctionnel (L. Lu *et al.*, 2012). Ils ont polymérisé le mélange en présence d'un peptide synthétique constitué de 35 acides aminés correspondants à la position 579–613 de la séquence du gp41. Il s'est avéré que le MIP présentait une affinité envers la molécule cible. La constante de dissociation (K_d) du MIP pour le peptide empreinte était similaire à celle des anticorps monoclonaux, à savoir 3.17 nM calculée grâce à des analyses de Scatchard¹. Une limite de détection de 2ng/mL a été atteinte et la performance pratique du biocapteur a été testée dans des échantillons d'urines humains donnant lieu à des

¹ Une méthode de représentation graphique des interactions entre deux molécules, obtenue en déterminant la concentration du complexe et de chacune des molécules libres à différentes concentrations de l'un des ligands. Cette méthode permet le calcul de la constante d'affinité (J-P. Revillard *et al.* 2001).

résultats satisfaisants. Selon les chercheurs, cette limite de détection était comparable à celle des méthodes ELISA. Grâce à sa biocompatibilité, la dopamine s'est démarquée du reste des monomères fonctionnels pour cette application. De plus cette méthode peut être adaptée pour d'autres biomolécules.

En général, l'impression moléculaire est une technique versatile pour l'impression de protéine. Hayden *et al.* ont utilisé une QCM comme élément transducteur associé à des MIP employant respectivement la trypsine amorphe, cristalline et solubilisée (O. Hayden *et al.*, 2006). Les différentes stratégies sont représentées dans la Figure II. 4. Les capteurs ont atteint une limite de détection d'enzymes de 100 ng/ mL et des temps de réponse de l'ordre de quelques minutes. La meilleure sensibilité a été obtenue dans le cas de l'impression aqueuse contenant la trypsine native: ce système peut différencier la trypsine dénaturée de la trypsine naturelle.

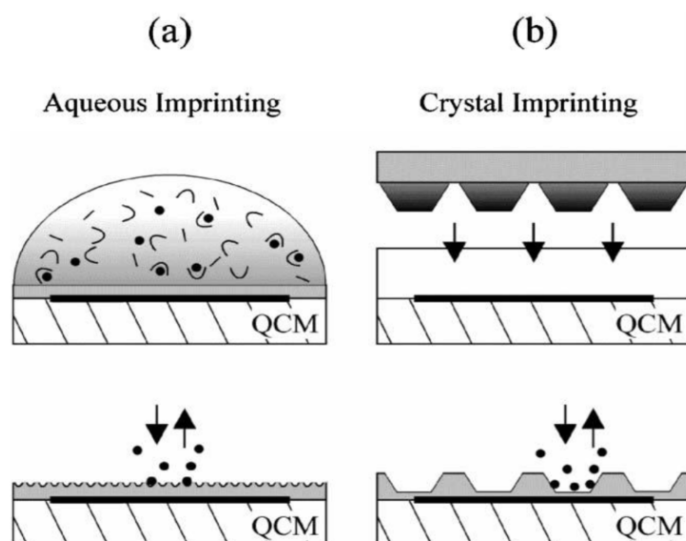
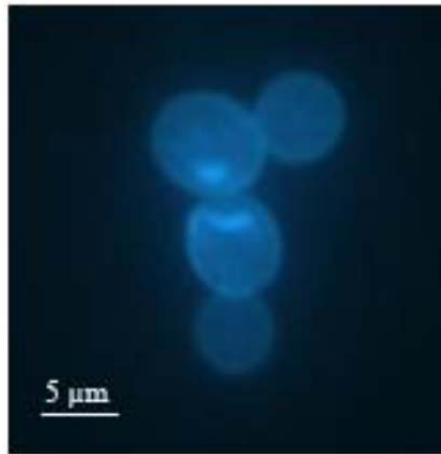


Figure II. 4 Les techniques d'impression en surface appliquées à des QCMs : (a) La solution monomère aqueuse contenant la molécule empreinte est versée à la surface du transducteur pour l'auto organisation des sites de reconnaissances à la surface de la couche mince. (b) Un tampon à forte densité de trypsine est appliqué à la surface du dépôt prépolymérisé, les empreintes sont extraites après polymérisation (M. Hussain *et al.*, 2013).

Dans le cas des cellules entières, les répliques synthétiques des cellules originales sont des empreintes prometteuses pour les techniques d'impression. La *Saccharomyces cerevisiae* (la levure de boulangerie), représentée dans la Figure II. 5, subit plusieurs stades de croissance qu'il est possible de distinguer de manière biomimétique. Seidler *et al.* (Seidler *et al.*, 2009) ont produit des copies artificielles à partir de cellules de levure via une approche de double impression.



*Figure II. 5 Image obtenue par microscopie fluorescente d'une cellule de levure (*S. cerevisiae*) en phase S marquée par du fluorochrome bisbenzimidazole (Seidler et al., 2009).*

Dans la première étape, un MIP est généré à partir des espèces biologiques natives à partir duquel un autre MIP est déposé en surface (e.g., PDMS). Le protocole d'impression utilisé est représenté sur la Figure II. 6.

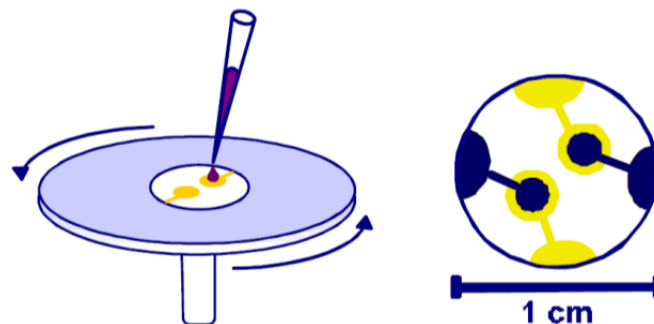


Figure II. 6 Protocole d'impression des cellules de levure : la solution est déposée à la tournette (2,500 rpm) à la surface d'une couche de polyurethane (PU)

Le tampon résultant imite les cellules de levure dans les phases G0 et S. En remplaçant l'empreinte naturelle de la Figure II. 7 par son analogue artificiel de la Figure II. 8, la synthèse du capteur peut être standardisée. Les caractéristiques du MIP résultant étaient similaires à celles du MIP imprimé avec les cellules de levure naturelles. Une amélioration de la marge de détection est possible en appliquant des approches de nez électroniques en parallèle : Une microbalance à quartz multicanaux, “*multichannel quartz crystal microbalance*” (MQCM), contenant quatre électrodes a été ainsi optimisée pour les mesures de l'effet de masse en milieu liquide. Cette configuration a permis de détecter simultanément

quatre molécules cibles, donnant lieu à un système de suivi pour la biotechnologie et le contrôle de protocole.

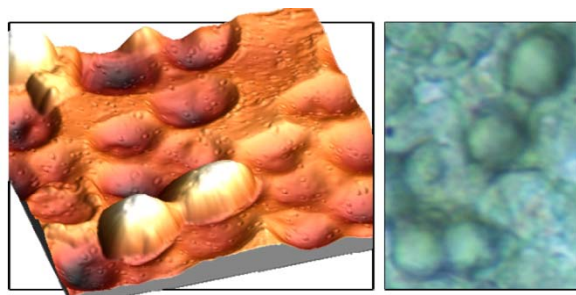


Figure II. 7 Image AFM d'un duplex en MIP de la cellule de levure (dimensions latérales $20 \times 20 \mu\text{m}$, axe vertical $5 \mu\text{m}$) et les empreintes des duplex des cellules (microscopie optique, $20 \times 25 \mu\text{m}$).

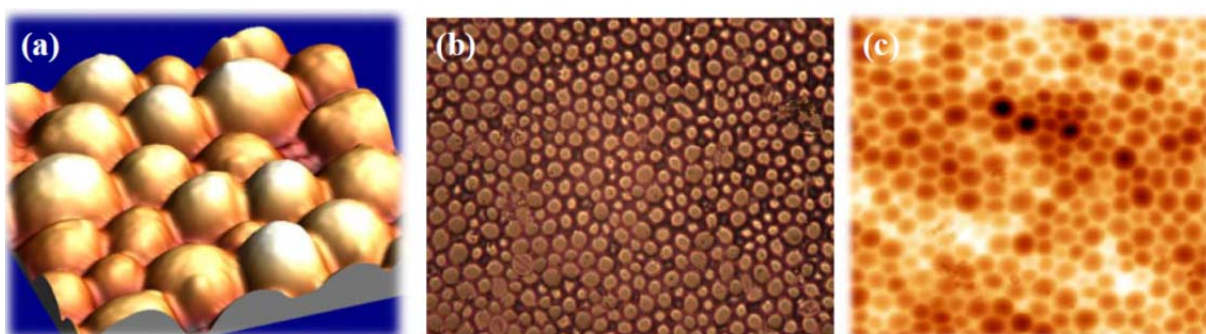


Figure II. 8 (a) Image AFM d'un tampon de cellules artificiel (dimensions latérales $20 \times 20 \mu\text{m}$, axe vertical $5 \mu\text{m}$), (b) Image par microscopie optique du même tampon ($125 \times 100 \mu\text{m}$). (c) Image AFM du MIP polyurethane résultant d'un tampon artificiel.

Dans une approche similaire, Jenik *et al.* ont fabriqué des cellules de levure synthétiques afin de les utiliser comme tampon pour l'impression en surface (M. Jenik *et al.*, 2009). Les couches résultantes peuvent différencier entre les cellules *S. cerevisiae* et *S. bayanus*, ce qui corrobore le postulat selon lequel le modèle fonctionnel des cellules de levure naturelles est reproduit de manière correcte dans la matrice polymérique. Les cellules naturelles et synthétiques ont conduit à la même sensibilité tandis que la sélectivité était trois fois supérieure pour les cellules synthétiques.

Les MIPs ont également été proposés pour les surfaces des cellules des protéines, comme le germe de blé agglutinin (WGA) lectin, un composant modèle pour les interactions entre les virus et les cellules. Wangchareansak *et al.* ont développé des MIPs imprimés en surface par le WGA qui étaient stables à des conditions de température ambiante et de pH neutre pour des mesures en milieu liquide et en temps réel (T. Wangchareansak *et al.*, 2011). Les résultats étaient reproductibles pendant trois semaines. Dans ce cas le MIP a démontré une affinité

envers le WGA contrairement au NIP qui n'avait pas adsorbé cette même cible. Des variations de fréquence positives ont été enregistrées indiquant des effets anti-Sauerbrey sur la micro balance à quartz. Si nous comparons les MIPs aux matériaux de reconnaissance naturels, nous pouvons tirer les conclusions suivantes : la sélectivité du MIP est typiquement dans le même ordre de grandeur que celle des anticorps naturels. Les mesures de sensibilité à l'effet de masse ont révélé que dans le cas des protéines, le MIP fonctionne comme un « noyau de condensation », ces systèmes présentent ainsi une sensibilité importante.

Lorsque les polymères sont utilisés dans leur état pur, c'est à dire, sans être combinés à des matériaux naturels, cela peut faciliter la formation de couches biologiques. Un exemple illustrant cette stratégie a été présenté dans les travaux de Mueller *et al.*, qui ont modifié des électrodes QCM par des couches minces de polyéthylène afin de faciliter la coagulation des protéines du sang à la surface du capteur et ont corrélé leurs mesures au temps de coagulation de tous les échantillons de sang humain (L. Mueller *et al.*, 2010). Le polymère dans ce cas, simule une surface extracorporelle et permet ainsi de déterminer le début de la coagulation sanguine. Cette approche devrait intrinsèquement conduire à un système de suivi de diagnostic qui injecterait aux patients sous sédation la bonne dose d'anticoagulants pendant la chirurgie. En utilisant la même procédure Sinn *et al.* ont appliqué des couches ultrafines de polyéthylène oxide-polypropylène oxide co-polymers NCO-sP(EO-stat-PO) pour la quantification d'adsorption de fibrinogène. Dans des études en temps réel comme celle-ci, l'adsorption de protéines du plasma et de cellules sanguines entrave la fiabilité des capteurs sanguins implantables. En utilisant une couche polymère, l'adsorption non spécifique d'espèces peut être réduite d'un facteur de 80% comparé aux électrodes du QCM (S. Sinn *et al.*, 2011).

II.3. La synthèse des polymères à empreintes moléculaires et leur intégration sur les capteurs piézoélectriques

L'histoire de la polymérisation d'empreintes moléculaires remonte à plus d'un quart de siècle, lorsque Wulff *et al.* de l'université de Düsseldorf en Allemagne ont décrit leurs expériences de préparation de polymères synthétiques avec des récepteurs de dérivés de sucre (G. Wulff *et al.*, 1972). Il existe essentiellement deux approches différentes d'impression moléculaire, dites covalente et non covalente (B. Sellergren *et al.*, 2001). Dans le cas de l'approche covalente, la molécule empreinte est liée de manière covalente au monomère tandis qu'elle est

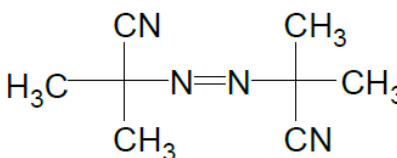
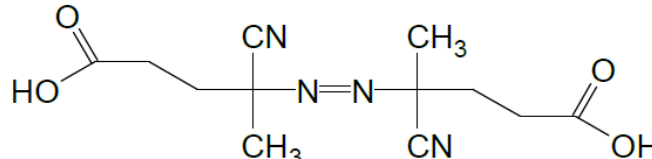
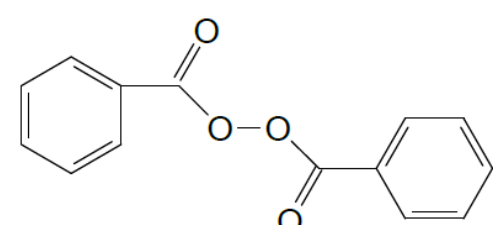
ajoutée séparément à la solution polymère dans le cas de l'approche non covalente. Les deux approches présentent bien évidemment des avantages et des limitations (D.A. Spivak *et al.*, 2004). En effet, des études chromatographiques comparatives ont révélé que la résolution chromatographique et le pic d'asymétrie sont plus favorables aux matériaux imprimés selon l'approche covalente. Toutefois, l'impression non covalente offre l'avantage de la simplicité car elle ne nécessite pas d'étapes supplémentaires afin d'introduire la molécule empreinte au sein de la matrice polymère (C.C. Hwang *et al.*, 2002). Par conséquent, l'extraction de la molécule empreinte est rapide et efficace puisqu'elle ne nécessite aucune rupture de liaisons fortes. Cet aspect confère un autre avantage aux techniques d'impression : comme les caractéristiques des interactions sont directement déterminées par la molécule empreinte, la méthode n'est nullement restreinte en termes de nature ou de taille de la molécule cible. Ceci reste vrai à condition que la molécule empreinte n'interfère pas avec la réaction de polymérisation. Tous ces avantages font des MIPs une plateforme technologique idéale pour la mise en œuvre de couches sensibles combinant à la fois une sensibilité élevée à une compatibilité aux techniques existantes ainsi qu'une simplicité de démarche de synthèse.

II.3.1. Réactifs utilisés pour la synthèse de MIPs

II.3.1.1. Les amorceurs

Dans la plupart des cas, l'amorçage de la polymérisation se fait par voie thermique ou par rayonnement ultra-violet (UV). De nombreux amorceurs peuvent être utilisés comme source de radicaux lors d'une polymérisation radicalaire. Généralement, des azo-amorceurs sont utilisés car ils sont capables d'amorcer un grand nombre de monomères, et cela que ce soit par voie thermique ou photochimique. L'inconvénient de ce type d'amorceur est qu'il forme des radicaux stables avec l'oxygène qui inhibent la polymérisation. Pour favoriser une bonne propagation de la polymérisation, il faut donc éliminer l'oxygène du milieu réactionnel. Cela se fait par ultra-sonication ou par bullage du milieu avec un gaz inerte. Le Tableau II. 1 illustre les amorceurs les plus couramment utilisés (M. Cadinot, 2008).

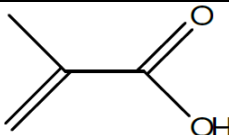
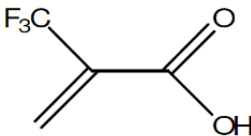
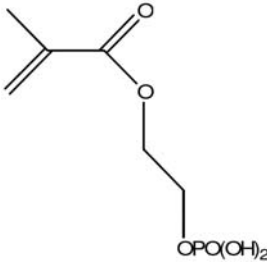
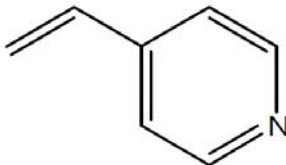
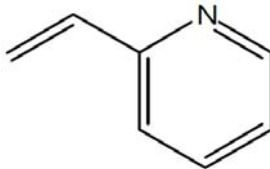
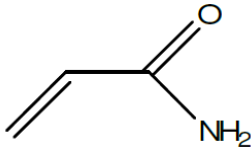
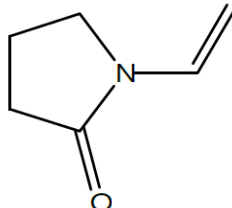
Tableau II. 1 Structure des amorceurs radicalaires les plus couramment utilisés pour la préparation de MIPs

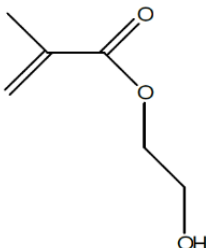
Nom de l'amorceur	Formule
azobisisobutyronitrile	
acide 4,4'-azo(4-cyanovalérique)	
Peroxyde de benzoyle	

II.3.1.2. Les monomères fonctionnels

Le choix du (des) monomère(s) fonctionnel(s) est primordial pour avoir une complémentarité des interactions avec la molécule à imprimer. Dans le cas de la voie covalente, la cible est liée de manière covalente au monomère fonctionnel pour former une cible polymérisable. En général, les monomères fonctionnels sont présents en excès par rapport à la cible afin de favoriser les interactions entre les fonctions de chacun. Le ratio monomère/cible optimal est déterminé par l'expérimentation avec des formulations contenant des quantités croissantes de cible. La formation du complexe monomère/cible est gouvernée par la constante d'équilibre du système. Le Tableau II. 2 présente les Monomères fonctionnels commercialisés pour la synthèse de MIPs par voie non covalente (M. Cadinot, 2008).

Tableau II. 2 Monomères fonctionnels commercialisés pour la synthèse de MIPs par voie non covalente (B. Claude, 2007).

Nom et abréviation du monomère		Formule
Monomère acide	acide méthacrylique (MAA)	
	acide (2-trifluorométhyl)acrylique (TFMAA)	
	2-(méthacryloyloxy)éthylphosphate (MEP)	
Monomère basique	4-vinylpyridine (4-VP)	
	2-vinylpyridine (2-VP)	
Monomère neutre	acrylamide (AA)	
	vinylpyrrolidone	

Nom et abréviation du monomère	Formule
2-hydroxyéthylméthacrylate (HEMA)	

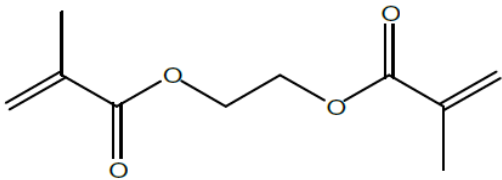
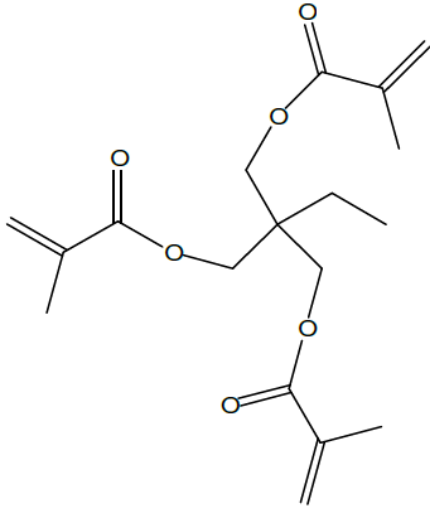
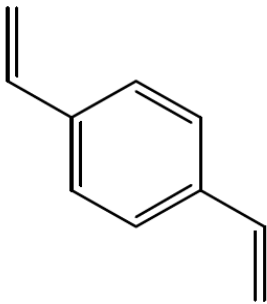
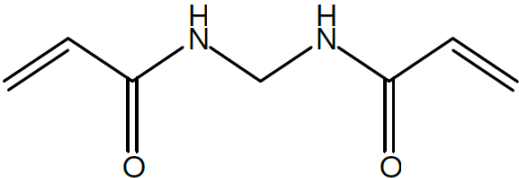
II.3.1.3. Les monomères réticulants

La sélectivité des MIPs est grandement influencée par le type et la quantité d'agent de réticulation. Celui-ci va permettre de :

- contrôler la morphologie de la matrice (gel de type macroporeux ou microgels),
- stabiliser la cavité correspondant à l'empreinte,
- apporter une stabilité mécanique à la matrice polymère,
- apporter des interactions complémentaires avec la cible, de type hydrophobe ou II, selon la nature du réticulant.

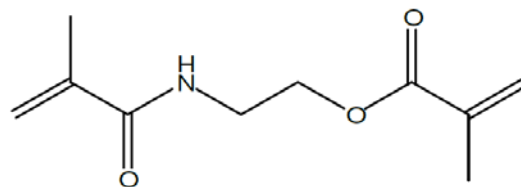
La quantité de monomères réticulant doit donc être suffisante pour préserver la stabilité des sites de reconnaissance. C'est grâce à cette rigidité que les microcavités tridimensionnelles gardent leurs formes complémentaires en structures et en fonctions chimiques à celle de la cible, même après son élimination. La rigidité de la matrice permet aux fonctions de rester dans leur position optimale pour que la reconnaissance soit efficace. Classiquement, le divinylbenzène, l'éthylène glycol diméthacrylate et le triméthylolpropane triméthacrylate sont couramment utilisés (M. Cadinot, 2008). Une liste de quelques agents réticulants est représentée en Tableau II. 3.

Tableau II. 3 Agents réticulant commerciaux (P-A.G. Cormack et al., 2004)

Nom de l'agent réticulant (abréviation)	Formule
Ethylène glycol diméthacrylate (EDMA ou EGDMA)	
Triméthylpropanetriméthacrylate (TRIM)	
Divinylbenzène (DVB)	
N,N'-Méthylène-bis-acrylamide (MDAA)	

N,O-bisméthacryloyléthanolamine

(NOBE)



II.3.1.4. Le solvant porogène

Dans la préparation de MIPs, le solvant joue le rôle d'agent porogène, c'est-à-dire qu'il va conférer une structure poreuse au MIP. La qualité et la quantité de solvant vont influencer sur la qualité de l'impression, ainsi que sur la structure même du MIP (morphologie, gonflement, taille des pores...). Pour choisir le solvant adapté, il existe quelques contraintes :

- il faut que les différents constituants du mélange soient solubles dans le solvant,
- le solvant doit produire des pores relativement larges pour permettre à la cible de rentrer et de sortir du polymère,
- le solvant doit avoir une faible polarité pour ne pas provoquer d'interférences pendant la formation du complexe entre les molécules à imprimer et les monomères (M. Cadinot, 2008).

II.3.1.5. Les cibles

La structure chimique de la cible a un rôle central, puisque c'est elle qui va définir l'organisation des fonctions portées par les monomères fonctionnels. Elle doit idéalement être inerte vis-à-vis des conditions de polymérisation pour pouvoir être compatible avec la polymérisation radicalaire, et ne pas entrer dans le mécanisme réactionnel. En conséquence, il est nécessaire de vérifier au préalable que la cible ne comporte pas de fonctions polymérisables, ni inhibitrices de la polymérisation. Par ailleurs, afin de former des empreintes moléculaires, la cible doit répondre aux contraintes exigées par le procédé de synthèse, c'est-à-dire qu'elle présente une stabilité thermique et/ou aux irradiations UV. Des bibliothèques de modélisation virtuelle évaluent le nombre et l'intensité des interactions existant entre la molécule empreinte et les monomères. Les mélanges de monomères proposés par la modélisation peuvent être testés en chimie combinatoire par la préparation d'un grand nombre de MIPs en faibles quantités (mini "MIPs"). La corrélation des sélectivités obtenues pour des MIPs préparés à petite et grande échelles est satisfaisante (B. Claude, 2007).

- **Élimination de la molécule cible**

L'élimination de la cible laisse apparaître une cavité bien définie dans le polymère, qui présente une structure et un arrangement en groupes fonctionnels, complémentaire de celui de la cible. Néanmoins, l'extraction de la cible n'est jamais totale. Ce problème est commun à tous les MIPs. Il est donc nécessaire de veiller à extraire le maximum de cibles avant d'utiliser le polymère afin d'optimiser la reconnaissance et ne pas être confronté à des phénomènes de relargage qui entraînent des problèmes de dosage important lors de l'évaluation de l'efficacité. Le solvant utilisé doit faciliter le gonflement du polymère et supprimer les interactions cible/polymère. Les solvants couramment utilisés sont le méthanol et l'acétonitrile en présence le plus souvent d'acide acétique afin de supprimer les liaisons hydrogène. L'extraction est fréquemment faite dans un Soxhlet à chaud. Dans le cas des MIPs préparés par voie covalente, une étape d'hydrolyse au préalable est nécessaire. Les tests de reconnaissance moléculaire ne sont réalisés que lorsque l'élimination de la cible est maximale (M. Cadinot, 2008).

- **Réinsertion de la molécule cible**

Cette étape consiste à placer le polymère imprimé dans une solution de concentration connue en molécule cible afin de reformer les liaisons chimiques avec la matrice polymère. Après un temps fixé, le surnageant est prélevé et sa concentration est déterminée. Elle est comparée à celle de la solution mère avant sa mise en contact avec le matériau. La différence permet d'évaluer la quantité absorbée et donc la capacité du MIP. La même expérience est réalisée avec un polymère non imprimé.

Des informations se rapportant à la préparation des MIPs ainsi qu'à l'application des capteurs PZ sont présentées dans le Tableau II. 4.

Tableau II. 4 Les MIPs associés aux capteurs piézoélectriques pour les applications de détection (le tableau de la revue de (M. Avila et al. 2008) a été complété par des références plus récentes)

Monomer/Réticulant	Initiateur	Empreinte	Synthèse du MIP	Sensibilité	Référence
		Agglutinin (WGA) lectin	MIP déposé par spin-coating sur la microbalance à quartz	160µg/mL	(T. Wangchareansak et al., 2011)
DMAPMA/TEGDMA	CHP- TMEDA	Albumin	Spin coating et polymérisation par radiation UV pendant 36h. Extraction de l'albumin avec du	60–150 ppm	(M. Avila et al., 2008)

Monomer/Réticulant	Initiateur	Empreinte	Synthèse du MIP	Sensibilité	Référence
			methanol (20%)		
MAA/EGDMA	AIBN	Amino-pyrine	Polymérisation en température et extraction de l'empreinte par Soxhlet	5×10^{-8} – 1×10^{-4} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDMA	AIBN	Atrazine	Introduction de groupes vinyl à la surface des électrodes en or et polymérisation directe par radiation UV à 4°C pendant 2h. Extraction de l'empreinte par du méthano/acide acétique (7:3)	1–10 μ M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDMA	AIBN	Atrazine	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	2.0×10^{-6} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
4-VP/DVB	Benzo-phenone	Bilirubin	Dépôt par SAM. Polymérisation par UV. Le template était extrait par immersion du cristal dans du NaOH (10 mM).	0.45–11.0 mg/dl	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
		Bisphenol A	Le MIP a été synthétisé directement à la surface d'électrode en or recouvertes par des SAMs. Le template était extrait par du méthanol-acide acétique (15 :0.5)	100–600 ppb	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	Caféine	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par poly-cyanoacrylate ester (PCAE)/MIP.	1.0×10^{-9} –1 mg/ml	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	Caféine	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet.	10–1000 ng/ml	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
			Spin coating par PVC/MIP	5×10^{-9} – 1×10^{-4} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/DVB	AIBN	Caféine	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet.		(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
		Creatine	Photogreffage par radiation UV à la surface d'électrode en or recouvertes de SAMs.	25–600 μ M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
DEAEM/MBSC	ACVA	Domoic acid	Dépôt de SAM. Dépôt de carbodiimide et de 1-hydroxybenzotriazole dans l'éthanol. Polymérisation par	2–300 μ g/l	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)

Monomer/Réticulant	Initiateur	Empreinte	Synthèse du MIP	Sensibilité	Référence
			radiation UV. Extraction de l’empreinte avec du méthanol		
MAA/EGDA	AIBN	Epinephrine	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	5.0×10^{-8} – 2.0×10^{-5} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
		Fibrinogen	Les électrodes QCM ont été modifiées par des couches minces de polyéthylène afin de faciliter la coagulation des protéines du sang à la surface du capteur.	–	(L. Mueller <i>et al.</i> , 2010).
		Fibrinogen	Des couches ultrafines de polyethylene oxide-polypropylene oxide co-polymers NCO-sP(EO-stat-PO) ont été appliquées pour la quantification d’adsorption de fibrinogen.	–	(S. Sinn <i>et al.</i> , 2011)
Dopamine		Glycoprotein 41, gp41	Stratégie d’impression d’épitope sur une microbalance à quartz. Polymérisation le mélange en présence d’un peptide synthétique.	2ng/mL	(L. Lu <i>et al.</i> , 2012)
MAA/EGDA	AIBN	Glucose	Formation de SAM de Methacryloylamidocysteine (MAC) sur les surface en or. Polymérisation par radiation UV. Le template était extrait avec du HCL (1M) et du méthanol	0.07–8 mM	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	Herbicide	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	2.0×10^{-7} – 5.0×10^{-4} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
		L-histidine	Electropolymérisation dans l’acrylamide,		
		D-histidine	N, N_methylenebisacrylamide, NaNO ₃ , Na ₂ S ₂ O ₈ , et (Lhistidine ou D-histidine) par voltamétrie cyclique. Extraction de l’empreinte par du HCL (0.1M)	$5-15 \times 10^{-4}$ M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	Nandrolone	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	0–0.1 mg/l	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	Niacinamide	Polymérisation en température et	5.0×10^{-9} –	(M. Avila <i>et al.</i> ,

Monomer/Réticulant	Initiateur	Empreinte	Synthèse du MIP	Sensibilité	Référence
			extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	1.0×10^{-6} M	2008)
MAA/EGDA	AIBN	Nicotine	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	5.0×10^{-8} – 1.0×10^{-4} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA or 4-VP/EGDA	AIBN	Paracetamol	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	5.0×10^{-8} – 1.0×10^{-4} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AMPN	Phenacetin	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	5.0×10^{-8} – 5.0×10^{-4} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	Phenobarbital	Polymérisation en température et extraction en Soxhlet. Spin coating par PVC/MIP	9.0×10^{-8} – 5.0×10^{-5} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/TRIM	ABAH	Propranolol	Le MIP était synthétisé insitu sur des électrodes en aluminium recouverte par SAMs et irradié par UV (350nm) à 4°C pendant 2-4 heures	0.1–4 mM	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
			L'empreinte a été extraite par acétonitrile		
MAA/EGDA	AIBN	Pyrimethamine	Polyérisation en température et extraction de l'empreinte par Soxhlet	6.0×10^{-7} – 1.0×10^{-4} M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	L-menthol	Le film polymère était déposé en étalant la solution polymère directement à la surface de l'électrode. La polymérisation était initiée par radiation UV grâce à une lampe mercure.	0.1–1 mg/l	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
		Saccharomyces cerevisiae	Approche de double impression : un MIP est généré à partir des espèces biologiques natives à partir duquel un autre MIP en PDMS est déposé en surface. Le MIP est appliqué à une MQCM		(K.Seidler <i>et al.</i> , 2009)
MAA/EGDA	AIBN	Terpenes	Dépôt par monocouches auto assemblées. La solution MIP a été déposée directement à la surface du QCM et gardée à 60°C. Extraction du template avec du		(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)

Monomer/Réticulant	Initiateur	Empreinte	Synthèse du MIP	Sensibilité	Référence
			methanol et de l'acide acétique (15:0.5)		
MAA/EGDA	AIBN	Theophylline	Polymérisation en température et extraction par Soxhlet. Etalement du PVC/MIP sur l'électrode	$10^{-9} - 10^{-6}$ M	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
		Trypsine	QCM		
			(a) La solution monomère aqueuse contenant la molécule empreinte est versée à la surface du QCM (b) Un tampon à forte densité de trypsine est appliqué à la surface du dépôt prépolymérisé,	100 ng/ mL	(O. Hayden <i>et al.</i> , 2006)
AM/TRIM	AIBN	L-Tryptophan	Dépôt par monocouches auto assemblées (SAM). Le MIP-QCM a été polymérisé par la méthode sandwich par une lampe à mercure à 365nm. Le template a été extrait par de l'éthanol-acide acétique (1 :9)	$8.8 \times 10^{-3} - 4.5$ mM	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	Vanillin	Polymérisation en température et extraction de la vanilline en Soxhlet.	1.3–65 μ M	(M. Avila <i>et al. et al.</i> , 2008)
			Spin coating par PVC/MIP		
AA/EGDA	AIBN	Tobacco mosaic viruses (TMV)	La solution était déposée par spin-coating et polymérisée sous UV. L'empreinte était extraite par du SDS (0.2%)	100 ng/mL–1mg/mL	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
MAA/EGDA	AIBN	CVO	Polymérisation en température	0–4.99 mg/g (p-xylene),	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
			Spin coating par PMMA/MIP	0–4.28 mg/g (toluene)	
MAA/EGDA	AIBN	CVO		0–1000 ppm (1-propanol)	
			Spin coating par PVC/MIP	0–3000 ppm (ethyl acetate)	(M. Avila <i>et al. et al.</i> , 2008)
				0–120 ppm (limonene)	
MAA/EGDA	AIBN	2-methylisoborneol	La solution a été déposée à la surface du QCM et polymérisée à	5–1000 mg/L	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)

Monomer/Réticulant	Initiateur	Empreinte	Synthèse du MIP	Sensibilité	Référence
		(MIB)	40°C pendant 48h sous azote. L'empreinte était extraite par de l'éthanol		2008)
Diacylate	–	Hexachloro-benzene	Polymérisation d'une couche du polymère déposé par spin coating à la surface d'une QCM 10MHz	10–12 mol/L	(M. Avila <i>et al.</i> , 2008)
PMMA	–	Formaldehyde	Assemblage couche par couche de poly(methacrylic acid) imprimé et de nanoparticules core-shell en pour former des structures sandwich. Une QMB (10 MHz) a été recouverte par les couches hybrides PMAA/Au-NPs. Mesures à 25 °C et 50% d'humidité.	152 ppb	(N. Iqbal <i>et al.</i> , 2014)
MAA-AA		Bovine Serum Albumin (BSA)	Etude de l'influence de certains paramètres sur la réponse du capteur (QCM). Le polymère optimal contient 70% de réticulant.		(NVH. Phan <i>et al.</i> , 2014)
[MAAP-Fe(III)]		Caffeic acid	Une nano QCM associée au monomère Methacrylamidoantipyrine-iron(III) [MAAP-Fe(III)]. Caractérisation par AFM.	7.8 nM	(A. Gultekin <i>et al.</i> , 2014)
[MAH-Cu(II)]		Cholic acid	Une nano QCM associée à un MIP à base du monomère methacryloylamidohistidine-copper (II) (MAH-Cu(II)). Caractérisation par AFM.	0.01–1000 µM	(A. Gultekin <i>et al.</i> , 2014)
PAA		Acides organiques (acide propenoic, acide hexanoic, et l'acide octanoic)	Un réseau de 3 QCM a été associé au monomère Polyacrylic acid (PAA). Le temps de réponse était de 5 à 14s.		(S.K. Jha <i>et al.</i> , 2014)
		Nanoparticules d'argent	MIP imprimé par des nanoparticules. Les affinités de différents polymères envers des nanoparticules d'argent ont été testées par les variations de fréquence d'une QCM.	–	(P.A. Lieberzeit <i>et al.</i> , 2014)
		Staphylococcal enterotoxins (SEs)	Une QCM associé à un MIP recouvert par des organosilanes et la molécule empreinte.	SEA: 7.97 ng/mL SEB: 2.25 ng/mL	(N. Liu <i>et al.</i> , 2014)

II.3.2. Les techniques d'immobilisation des MIPs à la surface des capteurs piézoélectriques

Il existe généralement, deux méthodes pour associer les MIPs aux transducteurs. La première consiste à immobiliser à la surface du transducteur un MIP préparé à l'avance par piégeage physique ou couplage chimique (M. Zougagh *et al.*, 2005). La deuxième consiste à assembler in situ une couche polymère directement à la surface du transducteur (T.Y. Lin *et al.*, 2004). Ces procédures sont décrites dans le Tableau II. 4 qui présente succinctement les méthodes utilisées par les auteurs pour la synthèse des MIPs.

II.3.2.1. Immobilisation par piégeage physique ou couplage chimique

Cette approche inclut, dans un premier temps, la formation d'un complexe entre un monomère fonctionnel et une molécule invitée (empreinte) dans une solution appropriée et la rigidification de ce complexe par polymérisation en présence d'un réticulant. Dans un second temps, la molécule empreinte est extraite par un lavage donnant lieu à des cavités (des empreintes), qui sont spécifiques et complémentaires à la molécule empreinte. Le MIP est ensuite déposé en couche mince à la surface du transducteur. Les monomères fonctionnels généralement retenus pour cette méthode sont le méthacrylic acid (MAA), le vinylpyridine (VPy) et les dérivés de l'acrylamide. La polymérisation de type thermal est généralement initiée grâce au 2,2-azobis(isobutyronitrile) (AIBN), tant dis que la polymérisation photochimique est effectuée avec l'AIBN, les benzophénones ou les dérivées de acétophénone. Parmi les solvants porogènes, le solvant polaire (DMF) est largement utilisé lorsqu'il s'agit de développer des capteurs pour des applications liquides afin de minimiser les effets de gonflements (M. Matsuguchi *et al.*, 2006). La conclusion la plus pertinente que l'on peut retenir de la préparation des MIPs en couches minces pour les applications capteurs est que leur flexibilité (contrôlée par le ratio monomère fonctionnel/réticulant) affecte directement la performance du capteur. Les formules traditionnelles incluent de forts rations de réticulant (5 :1 mole de monomère fonctionnel), ce qui favorise la création de cavités de reconnaissance et d'obtenir une résistance mécanique. Pour les dispositifs piézoélectriques auxquels on associe des couches sensibles, il a été observé qu'un certain degré de flexibilité favorise la recapture de l'empreinte et améliore l'adhérence à la surface du capteur. Un compromis entre la quantité minimum de réticulant nécessaire à l'obtention d'une mémoire et la flexibilité du polymère doit ainsi être établi. (T. Sergeyeva *et al.*, 1999).

II.3.2.2. Immobilisation “ in situ ” à la surface du transducteur

L'utilisation de monocouches d'azoinitiateurs immobilisées en surface pour la synthèse in situ d'un polymère représente une avancée significative dans le traitement des surfaces (B. Liederg *et al.* , 1998). Cette technique évite les problèmes d'encombrement stérique, de faible adsorption et les faibles interactions entre le polymère et la surface, communs à la technique de greffage de polymères présynthétisés. Toutefois, l'inconvénient majeur des méthodes courantes est le recours à la synthèse de monocouches de précurseurs ou au traitement prolongé du substrat (K. Haupt *et al.*, 1999). La méthode la plus utilisée pour l'immobilisation de polymères sur des capteurs PZ consiste à introduire des azo-initiateurs à des monocouches auto assemblées (SAMs) de thiolate d'alcane sur de l'or en utilisant des réactifs disponibles dans le commerce et une chimie simple. Le choix des thiolates d'alcane est justifié par la possibilité de varier l'épaisseur du substrat en or permettant ainsi l'utilisation d'une variété de techniques analytiques de réflectance (e.g., SPR et ellipsométrie) et de transmittance (e.g., microscopie et spectroscopie).

- ***Préparation des SAMs***

La technique la plus utilisée pour la préparation des SAMs organosulfurés est l'auto assemblage à partir de solvants organiques ou aqueux. Le protocole consiste à immerger un substrat propre recouvert d'une couche en or dans une solution de thiol, de sulfure ou de disulfure. Les propriétés des SAMs dépendent de la température, du solvant utilisé, de la pureté du thiol, du temps d'immersion et de la qualité du substrat.

- ***La photopolymérisation***

La seconde étape est la polymérisation par irradiation ultraviolet en présence de l'empreinte. En tant que méthode alternative au système de monocouches de thiols d'alcane décrit précédemment, il est possible de greffer un polymère de manière covalente à la surface d'un substrat traité par SAM. Parmi les stratégies d'immobilisation disponibles, l'utilisation des groupes terminaux –COOH est recommandée. Ces SAMs seront activées grâce à une réaction carboimide et vont subir une réaction de substitution en présence de la solution de polymérisation contenant l'empreinte. Ceci conduit à la formation d'une couche de polymère greffée à la surface d'un capteur PZ aussi bien que des microsphères polymères en solution. Le mélange est ensuite irradié par une lumière UV.

- **La formation du MIP**

La dernière étape est la formation du MIP à la surface du transducteur. Après la polymérisation, le capteur PZ est incubé dans un solvant organique afin d'éliminer les homopolymères, les résidus chimiques et les empreintes.

II.3.2.3. Electropolymérisation

L'utilisation de la technique d'électropolymérisation dans la préparation des MIPs est une autre possibilité qui permet la formation de couches ultra minces de polymères à la surface des capteurs. Cette méthode est généralement utilisée pour la préparation in situ des MIPs et présente l'une des méthodes les plus intéressantes pour le développement des capteurs PZ. La membrane ainsi formée peut aisément croître et adhérer à la surface et l'épaisseur peut être contrôlée par la magnitude du courant appliqué. Différents types de membranes peuvent être générées (e.g., acide poly(méthacrylique) et le polyacrylamide) mais dans la plupart des cas, c'est l'électropolymérisation d'acrylamides qui a été utilisée (H. Liao *et al.*, 2004). Les polymères acrylamides sont capables d'absorber les solvants 50 à 100 fois supérieurs à leur poids original ce qui implique une flexibilité au niveau de leur structure. La structure des cavités imprimées n'est pas rigide et ne perturbe pas l'effet d'impression (E. Schab-Balcerzak, 2011).

II.3.3.D'une technologie de reconnaissance volumique au développement d'une solution couche mince

L'immobilisation de la couche sensible de détection à la surface du dispositif est un aspect important dans la réalisation d'un capteur intégré. L'objectif est d'obtenir un dispositif fonctionnel, reproductible et stable dans le temps. Le contact entre le dispositif et la couche MIP doit être le meilleur possible afin de limiter les effets parasites de l'environnement. L'adhésion à la surface du support peut être obtenue de manière non covalente, par affinité des divers groupements du MIP et de la surface. La réalisation de traitement de surface comme par exemple un plasma O₂ peut influencer l'adhésion sur le support. Dans notre cas nous avons opté pour une manière covalente par réticulation de groupements sur le polymère et à la surface du support, appelé également le coating réactif.

Quelle que soit la méthode, le mélange réactif (monomères, réticulant, molécule cible, solvant) ou le polymère préformé (en solution ou non) est déposé de manière homogène à la surface grâce à des techniques classiques utilisées en technologie microélectronique.

Afin de démontrer que les MIPs sont compatibles avec les process de fabrication industriels, de nombreuses micropuces à base de MIP ont été fabriquées à l'échelle du wafer en utilisant des masques d'alignement commerciaux ou en étalant des précurseurs par spin-coating (Karsten Haupt *et al.* , 2006). Jusqu'à présent le dépôt en couche mince des MIPs a majoritairement été réalisé par des techniques telles que le spin-coating ou le dépôt localisé par robot. Ces méthodes ont prouvé qu'il y avait conservation du phénomène d'impression lors du dépôt (F. Vandevelde *et al.* , 2007).

Les films d'épaisseurs inférieures à 1µm restent parmi les formes les plus intéressantes pour les applications capteurs et ont fait l'objet de nombreux sujets de recherche ces dernières années (K. Das *et al.* , 2003), (H-H. Yang *et al.* , 2004), (T. Kunitake *et al.* , 2004), (P.A. Lieberzeit *et al.* , 2005), (K. Sreenivasan , 2006), (X. Li *et al.* , 2006). Outre le ratio surface/volume élevé, l'avantage le plus remarquable de cette technique est la possibilité d'intégration des films MIPs à la surface de différents transducteurs comme les électrodes électrochimiques (M. Riskin *et al.* , 2007), les microbalances à quartz (P.A. Lieberzeit *et al.* , 2005), (T. Piacham *et al.* , 2005) et les résonateurs plasmon de surface (SPR) (X. Li *et al.* , 2006) pour la détection des espèces cibles. L'approche la plus simple pour la réalisation des couches minces de MIP est l'étalement par spin-coating de solutions prépolymérisée sur un substrat, suivi par un traitement thermique (R-H. Schmidt *et al.* , 2004) (K. Das *et al.* , 2003). L'épaisseur du film peut être contrôlée en changeant la vitesse du spin-coating et la viscosité de la solution ; la porosité quant à elle, peut être ajustée en additionnant des polymères de faible poids moléculaire. Par exemple, des films de polymère imprimé à base de hexachlorobenzène d'une épaisseur de 400nm ont été réalisés par la méthode de spin-coating à la surface d'une QCM (K. Das *et al.* , 2003). La sélectivité et la sensibilité de ce capteur ont été évaluées et une limite de détection de 10-12 M a été atteinte avec un temps de réponse de 10 s. par ailleurs, Schmidt *et al.* ont utilisé différents polymères afin d'ajuster la morphologie de nanofilms déposés par spin-coating (R-H. Schmidt *et al.* , 2004), Ils ont pu ainsi obtenir différentes structures poreuses de MIP- propranolol. Un protocole sol-gel de surface pour la préparation de MIP à base de TiO₂ a été également développé (T. Kunitake *et al.* , 2004). Les couches minces de TiO₂ d'une épaisseur de 10~20 nm ont ainsi montré une meilleure capacité de recapture par rapport aux couches minces de polymère non imprimé. Reimhult *et al.* ont fonctionnalisé la surface d'une micro balance à quartz (QCM) par des nanoparticules de MIP déposées. Les nanoparticules étaient immobilisées à la surface du transducteur par piégeage physique dans une couche mince de poly(éthylène téréphthalate) (PET) déposée par

spin-coating à la surface de la micro balance. Le contrôle des conditions de dépôt a permis de rendre les sites de reconnaissance des nanoparticules accessibles à la solution de test. La capacité de recapture de ce capteur ainsi que sa spécificité ont été démontrées et une limite de détection de 25 μ M a été atteinte pour la molécule propranolol (K. Reimhulta *et al.* , 2008). Le Tableau II. 5 présente quelques approches de préparation de couches minces de MIP pour des applications de détection.

Nous avons choisi le procédé de dépôt à la tournette ou de spin-coating sur le capteur entier avec un masquage par kapton afin de localiser le film MIP sur la zone active des capteurs. Cette méthode semble permettre à priori une meilleure homogénéité de l'épaisseur de la couche sensible par rapport à la technique d'impression par jet d'encre (L. Elisabeth *et al.* , 2008), même s'il faut souligner que les techniques d'impression évoluent et pourront permettre vraisemblablement à court terme d'obtenir d'excellents résultats.

Tableau II. 5 Sommaire d'approches de préparation de couches minces de MIP pour des applications de détection

Molécule cible	Substrat	Epaisseur	Spécificité	Limite de détection	Référence
AMP	QCM	320 Å	DAMP et DAd	(~10 µmol dm ³)	(Kanekiyu <i>et al.</i> , 1999)
Propranolol	QCM	/	(R)- propranolol et (S)-propranolol	25µM	(K. Reimhult <i>et al.</i> , 2008)
acide carboxylique aromatique C3AzoCO ₂ H	/	10~20 nm	AzoCO ₂ H, et anthracene-9-carboxylic acid (9-AnCO ₂ H) et d'autres acides carboxyliques aromatiques comme (benzoic acid, cinnamic acid et octanoic acid)	0.25 mM.	(T. Kunitake <i>et al.</i> , 2004)
S-propranolol	Wafers en silicium	/	/	/	(R-H. Schmidt <i>et al.</i> , 2004)
Atrazine	Transducteur en verre (détection optique)	1–2µm	/	1.7 ppm	(A-S. Belmont <i>et al.</i> , 2007)

Albuterol	Capteur Voltametrique	/	/	10^{-6} M	(H-C. Huang <i>et al.</i> , 2004)
Hexachlorobenzene	QCM	400nm	Anisole, benzene, chlorobenzene et cyclohexane	10^{-12} M	(K. Das <i>et al.</i> , 2003)

II.4. Les caractéristiques analytiques des polymères à empreintes moléculaires associés aux capteurs piézoélectriques

La mise en œuvre d'un biocapteur implique l'association d'enzymes, d'anticorps ou d'organismes au transducteur afin d'obtenir un signal mesurable. Ces matériaux biologiques ont toutefois été remplacés par des composants artificiels comme les MIPs créant ainsi un capteur à base d'un mécanisme de reconnaissance biomimétique. La reconnaissance est due à la complémentarité des formes et des groupes fonctionnels entre la molécule empreinte et la structure 3D des sites de reconnaissance présents dans le polymère imprimé. La relation entre le changement de fréquence du capteur piézoélectrique ainsi fonctionnalisé et la concentration des molécules cibles est utilisée pour la quantification de celles-ci. Dans ce qui suit, quelques caractéristiques analytiques des méthodes de mise en œuvre des capteurs MIP-PZ sont discutées.

II.4.1. La sensibilité des capteurs piézoélectriques associés aux MIPs

Quelle que soit la nature exacte de l'analyte, l'intérêt majeur dans la conception des capteurs est idéalement d'atteindre une sensibilité élevée. L'augmentation de la fréquence du dispositif ou de la quantité de sites de reconnaissance au niveau du matériau sensible représentent des manières d'améliorer la sensibilité. L'utilisation de la reconnaissance d'un nombre croissant de molécules est le principe fondamental pour détecter de petites molécules par des dispositifs à effet de masse. Ce nombre croissant est atteint en appliquant des approches d'impression volumiques (Bulk) où comme le nom l'indique, la reconnaissance a lieu au niveau du volume entier du film polymère, surmontant ainsi les limitations de la sensibilité de surface pure. Dans ce cas, les molécules empreintes jouent un double rôle : d'une part, elles déterminent naturellement les propriétés stériques et chimiques des centres interactions au sein du matériau. D'autre part, elles déterminent souvent les voies de diffusion dans le matériau et rendent les sites de reconnaissance accessibles aux molécules cibles. Cette approche est ainsi adéquate à la détection des petites molécules de faibles poids moléculaires. En effet, en raison de leur petit poids et de leur petite taille, ces molécules n'entraînent de changement de fréquence que si une quantité suffisante est incorporée aux couches minces à la surface du capteur. Les techniques d'impression sont parfois critiquées en avançant l'argument selon

lequel il n'est pas possible de générer des sites de reconnaissance pour des composants plus petits que le monomère. Mais le contraire a été démontré en détectant de manière sélective une petite molécule acétaldéhyde en utilisant les méthacrylates adéquats. Par rapport à l'acétone, ces MIPs ont adsorbé 11 fois plus d'acétaldéhyde lorsqu'ils ont été exposés aux mêmes concentrations de gaz (M. Avila *et al.*, 2008). La sensibilité peut également être améliorée en appliquant un ensemble de deux molécules empreintes au lieu d'une (F.L. Dickert *et al.*, 2007). Comparé à une impression par une molécule unique, F.L. Dickert *et al.* ont démontré que les signaux de détection sont multipliés par un facteur de 5. Par ailleurs, une gamme linéaire se terminant par un plateau est enregistrée au-delà d'une concentration de 60.1 g/L de pyrène. En effet, la totalité des sites d'interaction disponibles était visiblement occupée. L'amélioration de la sensibilité concernant cette approche comparée à la technique d'impression par une seule molécule est liée à l'accessibilité des sites d'interaction, qui est une conséquence du grand nombre de chemins de diffusion dans le matériau. Ceux-ci sont évidemment générés par l'évaporation rapide des analytes de petites tailles, leur accessibilité est assurée par l'élimination lente des composants de plus grande taille. Les temps de réponse des couches résultantes peut varier de quelques secondes à quelques minutes et dépend étroitement de l'épaisseur de la couche.

II.4.2. La sélectivité des polymères à empreintes moléculaires

D.Spivak définit la sélectivité d'un MIP comme la conséquence de la formation de cavités de formes sélectives au sein de la matrice polymérique, issues de la préorganisation de groupes fonctionnels autour de la molécule empreinte (D. Spivak *et al.*, 1997). L'impression moléculaire est une technique de conception de récepteurs biomimétiques. Après l'extraction de la molécule empreinte, le MIP présente une sélectivité élevée envers les molécules d'impression en raison de la structure 3D et l'arrangement des groupes fonctionnels des unités du monomère autour des molécules empreintes. Avant son utilisation avec un capteur PZ, le MIP peut être évalué afin de vérifier ses propriétés de reconnaissance envers une molécule cible. Il est nécessaire de tester la sélectivité du MIP en utilisant des composants semblables au niveau structurel à la molécule empreinte. En effet, lorsque le MIP associé au capteur est appliqué afin de détecter des molécules dans des échantillons réels, toutes les autres molécules ayant des structures similaires présentes dans l'échantillon interfèrent et peuvent compromettre la détection. Si le MIP capture ces composants et qu'il présente une affinité similaire ou meilleure que celle qu'il possède envers la molécule empreinte, ceci indique une réactivité croisée (A. Jeppsson-Dadoun *et al.*, 2013). Dans ce cas, la sélectivité est testée avec

l'élément de reconnaissance par des essais sans la présence du capteur ignorant ainsi d'importantes interférences. La caractéristique unique des capteurs PZ réside dans la possibilité d'améliorer la détection en optimisant séparément le milieu de recapture et le milieu de mesure. De plus, certains interférents (structurellement semblables à la molécule empreinte) peuvent être identifiés grâce à leur signal PZ. Les MIPs conduisent parfois à des résultats qui peuvent être améliorés par le choix des monomères fonctionnels adéquats (e.g., la vinylpyridine pour la détection de paracétamol (Y. Tan *et al.*, 2001)). Des fonctionnalités peu prononcées peuvent être constatées (e.g., solvants aromatiques avec différents modèles de substitution (i.e. benzène, toluène and xylène)) pour les molécules empreintes utilisées pour la synthèse des MIPs polystyrène (Y. Fu *et al.*, 2003). Les auteurs ont démontré que le MIP recapture favorablement le toluène (la molécule empreinte) et démontre une faible réponse à d'autres analytes. La faible sensibilité envers la molécule o-xylène est directement liée à des considérations géométriques: le second groupe méthyle de la molécule xylène engendre un encombrement stérique ce qui complique l'insertion de la molécule xylène dans les cavités d'impression du toluène. La faible réponse au benzène révèle la grande sélectivité du matériau en dépit du fait que cette molécule soit complémentaire géométriquement aux cavités. Ces résultats démontrent les capacités de la technique d'impression, comme la sélectivité est générée par la présence ou la position d'un seul groupe méthyle. Cela peut être observé pour des molécules de tailles plus importantes (e.g., stéroïdes (F-L. Dickert *et al.*, 2004)). Les auteurs ont lié la molécule nandrolone (utilisée pour le dopage illégal en sport) de manière covalente au vinyl phenol pour incorporer ensuite ce mélange dans un polymère méthacrylate. Les matériaux résultants n'ont démontré aucune sensibilité croisée envers la testostérone et l'épistérone ce qui est remarquable du fait que ces deux molécules diffèrent de la nandrolone uniquement par un seul groupe méthyle, tandis que les conformations dans tous les centres stéréogéniques sont identiques. Ces sélectivités sont d'autant plus remarquables si l'on prend en compte la similitude des couches polymères. En effet, la fonctionnalité est conférée au matériau par le protocole d'impression qui force les chaînes croissantes à adopter les conformations déterminées par la molécule empreinte.

Une méthode alternative afin de résoudre le problème de réactivité croisée est l'utilisation d'une séparation par membrane SLM (*supported liquid membrane*), cette technique est illustrée en Figure II. 9. Quelques exemples expliquent ce phénomène concernant la détection de caféine, de vaniline dans des échantillons alimentaires (M. Zougagh *et al.*, 2005), (M. Avila *et al.*, 2007). Les auteurs ont accordé une attention particulière à la sélectivité de ces analytes

concernant leurs MIPs respectifs, concluant que d'autres analytes ayant une structure similaire à l'empreinte sont capturés par le MIP. Afin d'améliorer la sélectivité, la SLM a été couplée à un MIP-PZ. Les interférences ont été ainsi réduites de manière considérable car elles ne pouvaient pas traverser les membranes sous les conditions expérimentales. L'élimination de ces composants requerrait normalement des étapes laborieuses de prétraitement (E. Caro *et al.*, 2003). Les résultats ont ainsi montré que ces interférences ont pu être évitées en utilisant plus simplement la méthode SLM.

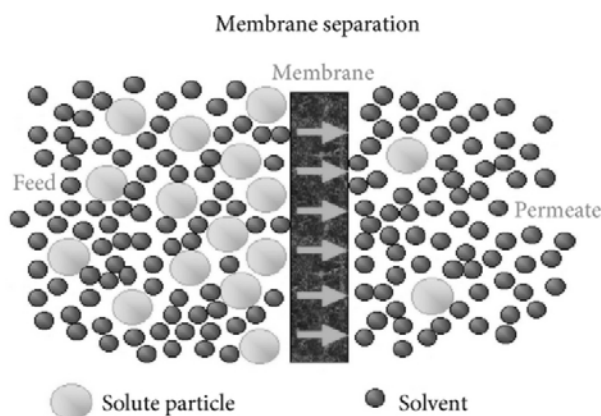


Figure II. 9 Un aperçu du transport des molécules et du solvant dans un protocole de séparation par membrane (R. Ghosh, 2006).

II.4.3. Autres propriétés analytiques

Il est communément relaté que les problèmes majeurs des MIPs dans le développement d'applications analytiques résident dans la difficulté d'atteindre de faibles limites de détection LODs (*Limit Of Detection*), une bonne stabilité ainsi qu'un temps de réponse court. Ceci a conduit à de nouvelles méthodes de fabrication visant à augmenter la concentration des sites d'impression. Dans le domaine des capteurs, il est ainsi fortement recommandé d'utiliser des moyens de transduction performants (e.g., capteurs PZ). Un bon exemple illustre ce phénomène où un MIP a été utilisé pour détecter l'atrazine (G. D'Agostino *et al.*, 2006), (C. Luo *et al.*, 2001). La LOD de l'ordre de 2 μM obtenue avec un capteur PZ était six fois plus faible que celle obtenue grâce à un capteur électrochimique (12 μM). Les MIPs utilisant l'acrylique ou le vinyle possèdent une grande stabilité durant un stockage prolongé (plus de six mois), comme prévu pour un polymère hautement réticulé (M.C. Blanco *et al.*, 2004). Pour atteindre une bonne reproductibilité et une réversibilité complète, ces systèmes requièrent des temps de lavages assez longs. Le recouvrement partiel de l'élément de reconnaissance n'est toutefois pas un problème car les capteurs MIP-PZ peuvent être

incorporés dans des dispositifs qui utilisent un nouveau composant peu coûteux lorsque la nécessité se présente. L'électropolymérisation est un autre moyen afin d'obtenir des capteurs reproductibles.

En principe, les capteurs MIP-PZ dédiés à des applications analytiques peuvent être catégorisés selon différents critères (e.g., le type du capteur ou le type de l'analyte). Pour notre part, nous allons distinguer principalement les échantillons liquides et gazeux. Les contributions et leurs aspects les plus importants sont listés dans le Tableau II. 4.

II.4.4. Les capteurs MIP pour la détection en milieu gazeux

En général, les capteurs associés aux MIP dédiés aux applications en milieux gazeux concernent principalement deux sujets :

- Capteurs de composants organiques volatils, à l'intérieur et à l'extérieur des immeubles
- Systèmes de surveillance d'intérieur destinés aux réseaux de capteurs et au contrôle en continu des immeubles

Les composés organiques volatiles (VOCs) revêtent une grande importance pour des raisons environnementales. Ils sont usuellement -bien que pas exclusivement- introduits dans l'environnement par l'homme et peuvent présenter une menace pour la nature et la santé humaine. C'est ainsi que l'analyse environnementale et le contrôle du milieu du travail ne peuvent pas être considérés séparément. Un aspect important concerne la détection d'odeurs et la détermination de leurs LODs. Matsuguchi *et al.* (M. Matsuguchi *et al.*, 2006) ont rendu compte de la synthèse d'un MIP mélangé à du PMMA en présence de toluène ou de p-xylène comme solvant, le matériau obtenu a été déposé sur une microbalance QCM pour détecter des VOCs. Le polymère réticulé dans le toluène avait une affinité envers le toluène tant dis que le polymère préparé avec le p-xylène avait des affinités envers les vapeurs de p-xylène. La réponse du capteur envers le toluène et le p-xylène était réversible, le temps de réponse était toutefois lent en raison de la présence de la matrice polymère autour des particules MIP. Une alternative pour répondre aux besoins de sélectivité et rapidité est l'utilisation des réseaux de capteurs. Un réseau de capteurs comprend autant de capteurs que d'analytes, assurant ainsi des résultats optimaux grâce à la redondance dans le système. Dans un tel système la sélectivité est finalement obtenue par traitement mathématique adapté des réponses. Plusieurs groupes ont choisi de déposer à la surface de leurs réseaux de capteurs des matériaux

caractérisés par la méthode GC “*Gas Chromatography*”. Ainsi, Dickert *et al.* (F-L. Dickert *et al.*, 2004) ont développé un réseau de six capteurs QCM associées à différents MIPs pour la détection d’alcools aliphatique, d’éthyle acétate et de limonène en plus d’un matériau sensible à l’humidité. Les dynamiques de réponses du capteur obtenues en ligne durant des mesures suivaient des modèles distincts. En effet, le signal de réponse à l’alcool présentait une décroissance avec l’augmentation de la concentration de l’éthyle acétate. Il présentait par la suite une croissance, lorsqu’aucun acide acétique n’était formé. La molécule de limonène a été détectée dans des stades ultérieurs. Des dynamiques de réponse similaires peuvent être observées par la méthode GC combinée à la spectrométrie de masse. De plus les données chromatographiques et les données du capteur concernant la molécule de limonène peuvent être corrélées entre elles. De même, Ji *et al.* (H-S; Ji *et al.*, 1999) ont développé deux capteurs d’odeurs MIP-PZ qui ont démontré une sélectivité envers un composé qui causait un problème d’odeur dans l’eau potable (e.g., 2-methylisoborneol (MIB)). La simplicité et l’efficacité de ces dispositifs ont été démontrées et la sensibilité a été multipliée par 20 en intercalant une couche de nylon entre le capteur QCM et le MIP.

II.4.5. Les capteurs MIP pour la détection en milieu liquide

Dans les échantillons liquides, un MIP doit avoir des propriétés de réactivité avec des analytes spécifiques. Ces propriétés comprennent l’insolubilité et la stabilité. Plusieurs études ont été consacrées à la détection de caféine (M. Matsuguchi *et al.*, 2006), (B-S. Ebarvia *et al.*, 2005), (B-S. Ebarvia *et al.*, 2004), (F-A. Villamena *et al.*, 2001) par association MIP-PZ. Zougagh *et al.* (M. Zougagh *et al.*, 2005) et Ebarvia *et al.* (B-S. Ebarvia *et al.*, 2005), (B-S. Ebarvia *et al.*, 2004) ont suivi la même procédure de synthèse décrite par Liang *et al.* (C. Liang *et al.*, 1999) pour la préparation du MIP. Dans ces travaux, un MIP a été appliqué à un capteur BAW. Un mélange de monomère MAA fonctionnel (*methacrylic acid*), de réticulant EDMA (*ethylene glycol dimethacrylate*) ou de DVB (*divinylbenzene*) ainsi que la molécule de caféine, a été polymérisé sous forme volumique. Après extraction de la molécule caféine, les polymères résultants sont en mesure de la recapture avec une affinité et une sélectivité élevées. Les capteurs BAW, modifiés par le PVC (*polyvinyl chloride*) ou le PCAE (*polycyanoacrylate ester*) et les particules de MIP immobilisées, ont démontré une grande sélectivité envers la molécule de caféine. L’applicabilité de ces travaux à des analyses d’échantillons réels a été démontrée dans deux travaux (M. Zougagh *et al.*, 2005), (B-S. Ebarvia *et al.*, 2005). Le problème majeur est dû aux interférences des autres molécules communément présentes dans les échantillons réels qui possèdent une structure similaire à la molécule empreinte,

engendrant ainsi une réactivité croisée. Tan *et al.* ont développé un capteur MIP-BAW pour la détection de paracétamol (Y. Tan *et al.*, 2001). Trois sortes de polymères ont été synthétisées avec deux types de monomère fonctionnel. La comparaison des résultats a montré que le polymère utilisant simultanément le MAA et 4-VP (*4-vinylpyridine*) comme monomères fonctionnels, possède la plus grande sensibilité et sélectivité. Afin d'étudier l'effet de la viscoélasticité du polymère sur les mesures, les auteurs ont employé l'analyse d'impédance dynamique du quartz. Il n'y avait aucune variation de la viscoélasticité durant la détection. Le capteur était stable et présentait une bonne reproductibilité. Des résultats satisfaisants concernant la détection de paracétamol dans des échantillons d'urines et de sérums humains ont été obtenus. Liao *et al.* ont synthétisé des membranes imprimées par les molécules L-histidine et D-histidine par électropolymérisation d'acrylamide sur des électrodes en or ou des électrodes en quartz recouvertes d'or en présence des molécules L-histidine et D-histidine (H. Liao *et al.*, 2004). La technique "*AC impedance spectroscopy*" a été employée afin de vérifier l'effet de l'empreinte sur les membranes. La recapture sélective des énantiomères de l'histidine par leurs membranes polymères respectives a été confirmée. Les résultats ont conduit à la fabrication de capteurs biomimétiques pour la détermination de L-histidine et la séparation de l'histidine.

II.5. Conclusion

L'impression moléculaire est ainsi une technique prometteuse qui connaît un attrait croissant en tant que matrice visant à créer des matériaux biomimétiques. Les aspects des MIPs qui nécessitent encore des recherches approfondies sont leurs méthodes de préparation et d'intégration aux transducteurs. Plusieurs publications utilisent essentiellement la même technique pour obtenir le matériau imprimé requis par polymérisation volumique suivie par une rupture de la structure monolithique résultante par broyage et tamisage. Ces matériaux sont appliqués par la suite à la surface des transducteurs par piégeage des particules MIPs. Cette technique présente des inconvénients car celle-ci est fastidieuse, longue et très souvent peu efficace. De plus, le broyage engendre des particules irrégulières qui peuvent être problématiques lorsqu'elles sont déposées à la surface des transducteurs sans compter les particules fines qui sont perdues lors du tamisage. Les nouvelles procédures de synthèse des MIPs (e.g., les méthodes *in situ*) et les améliorations des caractéristiques des particules MIP vont probablement contribuer à améliorer la facilité de synthèse et les applications générales des MIPs. L'impression moléculaire dans les SAMs peut être considérée comme une solution

optimale à l'échelle nanométrique afin de minimiser ces problèmes. Toutefois, l'inconvénient de cette technique d'impression est le manque de stabilité du film faiblement réticulé, avec la possible destruction des sites de reconnaissances par la diffusion latérale des molécules, notamment lorsque les empreintes sont extraites. La sélectivité et la cinétique d'association sont fortement affectées par la longueur des alkanethiols, si ceux-ci sont trop courts, il n'y a pas de reconnaissance et s'ils sont trop longs, ils sont susceptibles de bloquer les sites avec leur chaîne flexible, des énergies d'activation supérieures sont ainsi requises pour l'association. Les systèmes de formation de matrice optimaux sont le dodecanethiol (Official Methods of Analysis, 1990) et le tetradecanethiol (V.M. Mirsky *et al.*, 1999). Le faible développement des dispositifs PZ associés aux MIPs peut refléter les problèmes d'intégration de ces éléments de reconnaissance artificiels aux transducteurs piézoélectriques. A la base des études entreprises, il n'y a aucun doute que ces difficultés initiales vont être surmontées, et voici pourquoi des stratégies alternatives pour créer des surfaces imprimées ont été récemment explorées. En dépit du fait que plusieurs exemples de développement de MIP associés à des capteurs PZ existent, leur niveau de développement est relativement faible. Ceci est probablement dû à plusieurs aspects de la technologie qui restent encore à améliorer. En effet, divers problèmes clés liés au développement des MIPs doivent être résolus avant une commercialisation réussie.

Les problèmes majeurs à résoudre sont les suivants :

- Le développement et la validation d'un protocole général pour la synthèse des MIPs
- Le développement d'un MIP fonctionnel en milieu aqueux
- L'amélioration de l'affinité du polymère ainsi que le ratio entre les liaisons spécifiques et non spécifiques
- Le développement de protocoles d'immobilisation efficaces

Afin d'atteindre ces objectifs, les chimistes des polymères et les ingénieurs développant les capteurs doivent travailler en étroite collaboration pour une meilleure compréhension des MIPs. Cette approche pluridisciplinaire semble être l'une des meilleures manières afin de résoudre des problèmes réels dans divers champs d'applications. Le capteur acoustique à onde de Love choisi comme support de détection piézoélectrique ainsi que la configuration microfluidique associée en vue de la détection d'analogues de nucléosides, seront abordés dans le chapitre suivant.

III. Association du capteur acoustique à onde de Love à un dispositif microfluidique

III.1.Introduction

Après avoir exposé les avantages de l'association des polymères à empreintes moléculaires aux capteurs piézoélectriques dans le chapitre 2, nous allons décrire, dans ce chapitre, la géométrie et les caractéristiques électriques et électromagnétiques de la plateforme de transduction utilisable en milieu liquide. Pour nos travaux nous avons choisi un capteur acoustique à ondes de Love. L'objectif de ces travaux étant de détecter les analogues de nucléotides en milieu liquide, le capteur devait être associé à une plateforme microfluidique. La configuration de celle-ci est détaillée dans la suite du chapitre. Une partie sera également consacrée à la description des systèmes d'injection des liquides de test qui seront utilisés dans la suite de nos travaux. Par ailleurs, le système d'acquisition en temps réel utilisé pour la détection des analogues de nucléotides est présenté.

III.2.Le capteur à onde de Love

III.2.1. Structure de la ligne à retard

Les dispositifs à ondes de Love utilisés dans le cadre de ces travaux sont ceux développés et réalisés selon un protocole établi en collaboration entre l'IMS et la plateforme technologique du LAAS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes UMR CNRS 8001) de Toulouse, le lecteur pourra en retrouver une description plus complète dans des travaux antérieurs (H. Tarbague, 2011). Les capteurs ont une épaisseur totale de 500 μm . Ils sont constitués de deux lignes à retard, qui comportent chacune un transducteur d'entrée qui génère l'onde élastique par effet piézoélectrique inverse, tandis que le transducteur de sortie transforme de nouveau cette onde mécanique en signal électrique, par effet piézoélectrique direct.

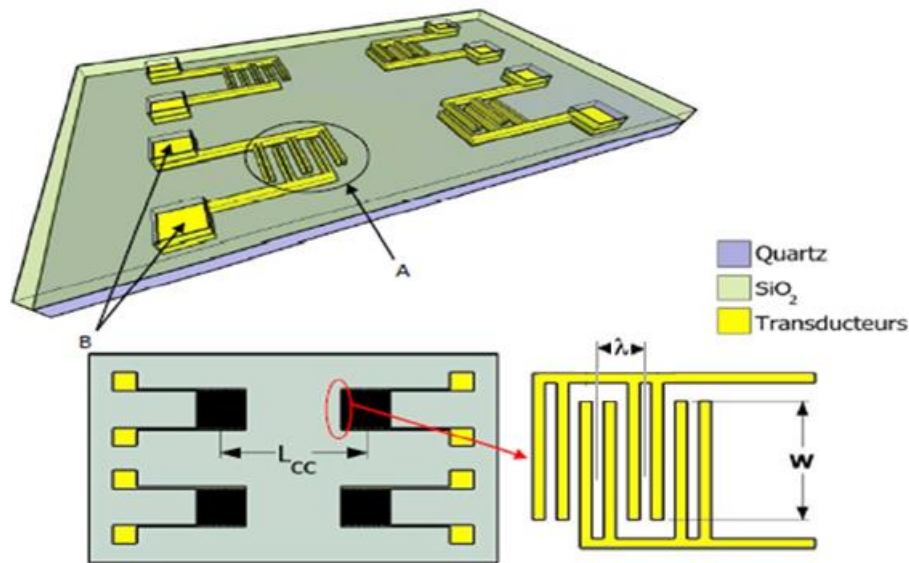


Figure III. 1 Capteur à onde de Love (H. Tarbague, 2011)

Les principales caractéristiques des lignes à retard sont décrites ci-dessous :

- Le substrat en quartz, de coupe cristallographique AT (angles d'Euler : 0° , 121.5° , 90°), choisie pour une propagation perpendiculaire à X qui permet de générer des ondes purement transverses horizontales et confère au capteur à onde de Love une sensibilité maximum.
- Les transducteurs composés chacun de 44 paires d'électrodes interdigitées (IDTs) et de deux plots de contacts, sont, en général, réalisés par dépôt de couches minces en Titane/Or déposées par évaporation sur le substrat. La périodicité spatiale des électrodes (ou doigts), λ est de $40\ \mu\text{m}$. L'ouverture des transducteurs, W , est de $40\ \lambda$.
- La couche guidante est un élément essentiel du fonctionnement du dispositif à ondes de Love. Cette couche permet de confiner l'énergie acoustique et assure ainsi la sensibilité à l'effet de masse du capteur à ondes de Love. C'est une couche de SiO_2 , de 4 à $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur pour une sensibilité maximale, typiquement déposée par PECVD (*Plasma Enhanced Vapor Deposition*) à une température (300°C) inférieure à la température de changement de phase du quartz. A la suite de ce dépôt, la couche est gravée chimiquement, après une nouvelle étape de photolithographie, afin de libérer les contacts électriques.

Le choix du SiO_2 est justifié par les nombreux avantages suivants :

- bonne rigidité
- faibles pertes acoustiques,
- bonne stabilité chimique et mécanique (résistance à de nombreux traitements chimiques),
- célérité acoustique inférieure à celle du quartz nécessaire au piégeage de l'onde de Love
- compatibilité avec les milieux biologiques,
- possibilité de fonctionnaliser sa surface,
- réutilisable.

III.2.2. La sensibilité à l'effet de masse

Le principe de détection d'espèces cibles par les capteurs à ondes acoustiques s'appuie principalement sur l'effet de masse, ou de manière plus générale sur un effet mécanique. Ainsi la sorption d'espèces entraîne une modification des propriétés physico-chimiques et il en résulte une perturbation de l'onde acoustique et notamment un changement de sa vitesse de phase et une variation de la fréquence d'oscillation pour un oscillateur fonctionnant sur un point equiphase comme illustré en Figure III. 2.

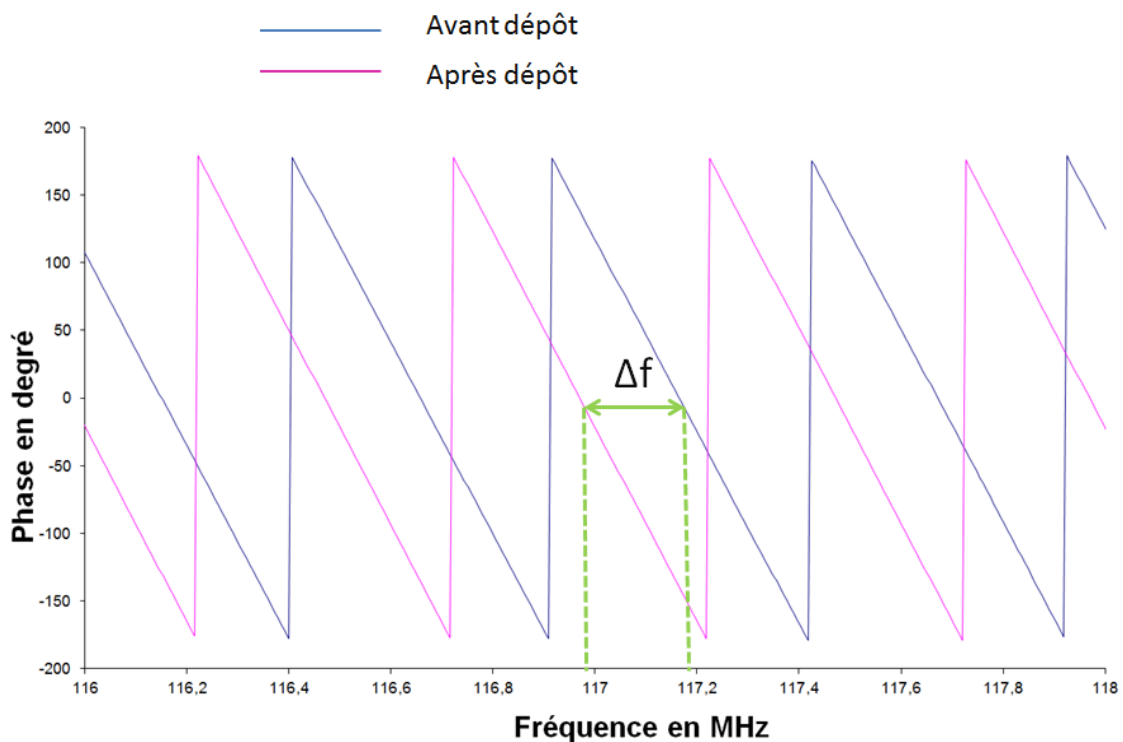


Figure III. 2 Décalage de la réponse de phase en transmission suite à un ajout de masse sur le capteur à onde acoustique

La sensibilité à l'effet de masse est définie comme la variation relative de vitesse ramenée à la variation de masse surfacique due au dépôt ou à une modification de la couche sur le chemin de propagation de l'onde acoustique. Cette sensibilité est définie par la relation suivante :

$$S = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{\Delta \rho_0 b}$$

- $\Delta V = V_0 - V_1$, la variation de vitesse,
- V_0 : la vitesse de phase du dispositif initial sans couche sensible ou avec couche non modifiée,
- V_1 : la vitesse de phase du dispositif après effet de masse ou avec couche modifiée,
- $\Delta \rho_0$: la masse volumique de la couche sensible ou sa variation,
- b : l'épaisseur de la couche sensible,

III.2.3. Caractérisation électrique des capteurs à ondes de Love

Les changements des conditions de propagation de l'onde de Love se traduisent par une modification de la vitesse et une atténuation de l'onde. Ces mesures ont été réalisées au moyen d'un analyseur de réseaux ANRITSU MS4623B (cf. Figure III. 3), pour nous permettre de contrôler le bon fonctionnement des dispositifs et de préciser leurs caractéristiques notamment en ce qui concerne les pertes d'insertion (N. Aouled Omar, 2013).

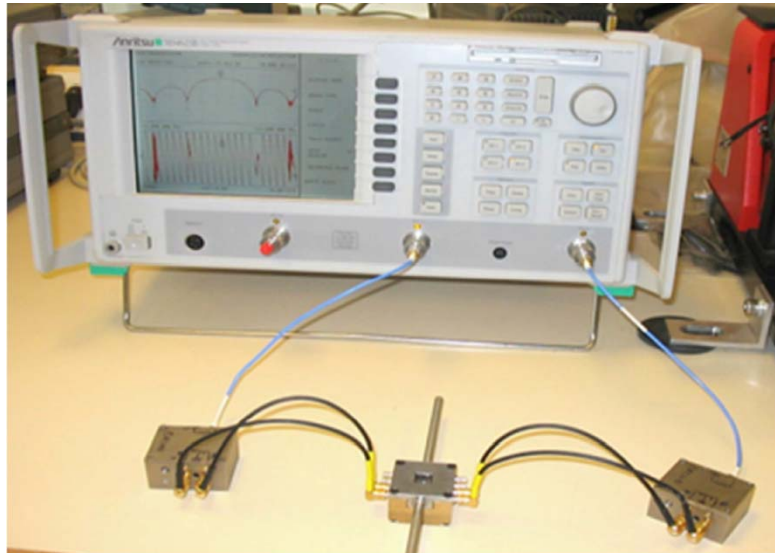
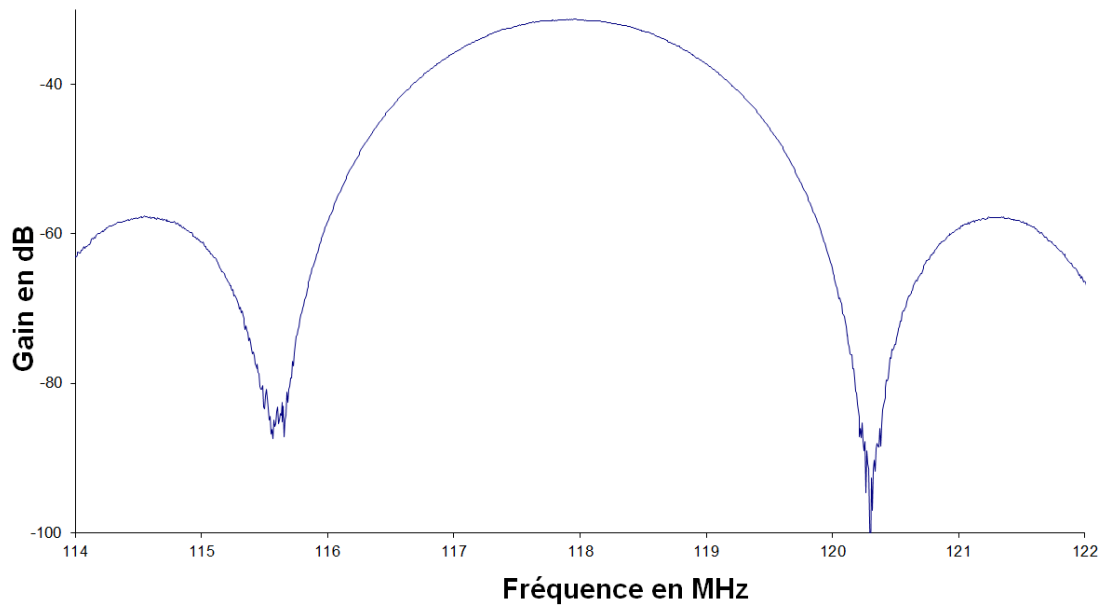


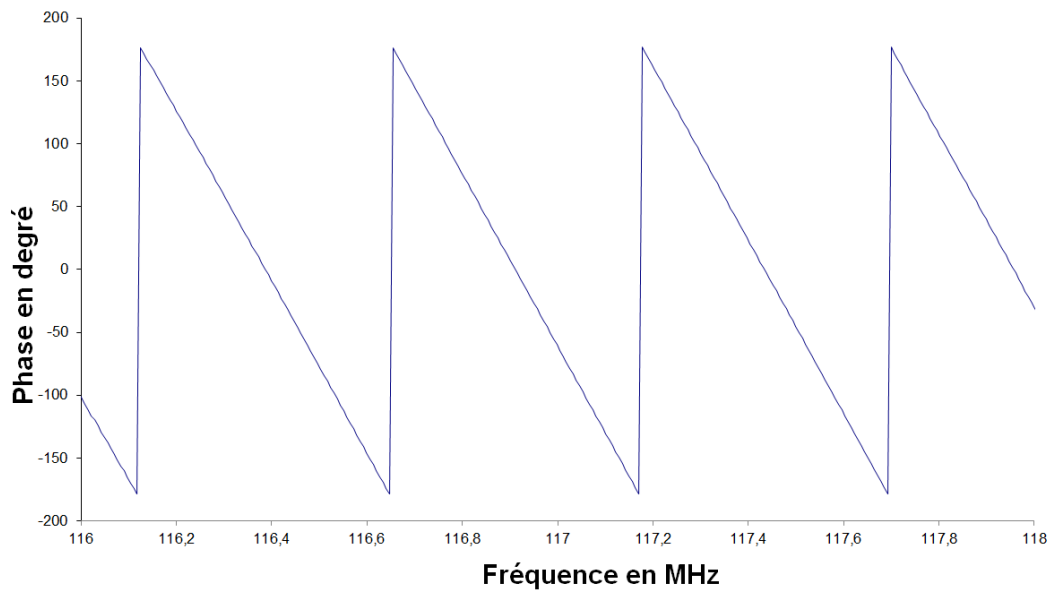
Figure III. 3 Caractérisation des capteurs à ondes de Love à l'analyseur de réseau

III.2.4. Réponse fréquentielle

Les réponses fréquentielles en transmission S21, soit le gain en amplitude et en phase caractéristique d'une ligne à retard à ondes de Love en fonction de la fréquence, sont présentées en Figure III. 4. La réponse en gain permet de retrouver une fréquence de résonance proche de 118 MHz qui correspond à la fréquence de fonctionnement attendue. Les niveaux des pertes d'insertions s'élèvent à 31 dB. La ligne de base qui se rapporte au niveau de bruit, est rejetée à des valeurs de -100 dB. En outre, nous pouvons remarquer la bonne linéarité de la phase dans toute la bande de transmission.



(a)



(b)

Figure III. 4 Réponse fréquentielle observée à l'analyseur de réseau: (a), amplitude, (b) phase

III.3.La microfluidique pour les applications biomédicales

III.3.1. Avantages de la microfluidique dans les analyses biomédicales

La détection et l'identification rapide des microorganismes représentent des questions pressantes dans des thématiques allant du diagnostic clinique et le contrôle des pathogènes alimentaires à la reconnaissance d'agents de guerre biologique.

Il est bien connu que les systèmes de santé qui bénéficieraient d'un diagnostic plus rapide et précis réduiraient considérablement les couts des soins en fournissant simultanément de meilleures données épidémiologiques qui pourraient être utilisées pour la modélisation des maladies infectieuses (P. Yager *et al.*, 2006).

En dépit du progrès important dans le domaine du diagnostic, des méthodes plus précises rapides et portables sont nécessaires. Les recherches en cours pour améliorer ces méthodes sont particulièrement importantes puisque les outils conventionnels d'identification sont consommateurs en temps et en travail. De nos jours, les méthodes standards de diagnostic dans le monde comme les cultures, les tests immunologiques d'enzymes et les PCR prennent deux à quatre jours pour révéler les résultats. En outre, la plupart des laboratoires centralisés étant limités aux grandes villes, les analyses au chevet même du patient en utilisant des dispositifs POCs deviennent de plus en plus importantes. En conséquence, des outils de diagnostic portables et capables de fournir rapidement des informations sur les éléments pathogènes peuvent réduire les taux de mortalité et d'hospitalisation. Même si un vaste éventail de biocapteurs a été développé dans les vingt dernières années, un effort considérable reste à faire en termes de miniaturisation et de cout afin de disposer de capteurs capables d'identifier rapidement et de manière précise une large gamme d'éléments pathogènes. Les efforts récents pour minimiser le temps entre la prise d'échantillon et la révélation des résultats comprennent l'utilisation de dispositifs miniaturisés qui ne dépendent pas d'une infrastructure spécialisée ni des procédures de préparation d'échantillons (O. Lazcka *et al.* , 2007).

Le domaine des systèmes d'analyse microfluidique miniaturisés, appelés également “micro total analysis systems (μ TAS) ou lab-on-a-chip (LOC)”, a gagné en popularité (R. Gomez *et al.* , 2001). Au départ, la miniaturisation avait pour motif l'amélioration de la performance analytique mais il s'est avéré que la réduction de la taille présentait d'autres avantages comme une consommation réduite des solutions de réaction et la possibilité d'intégrer les techniques de séparation et de contrôle sur un seul et même système (P-A. Aurox *et al.* , 2002).

La capacité des systèmes microfluidiques à conduire des mesures efficaces et rapides à partir de petits volumes de fluides complexes, sans pour autant avoir besoin d'un opérateur qualifié, est considérée comme l'application la plus avantageuse des technologies des laboratoires sur puce. Les dispositifs LOC portables capables d'accomplir des procédures de diagnostic complexes, qui sont habituellement réalisées en laboratoires, sont susceptibles de fournir aux personnel de santé et aux patients externes des informations importantes sur l'état de santé et ce même dans les zones les plus reculées. Globalement, l'intérêt majeur des technologies microfluidiques est de permettre le basculement vers une approche centrée sur les patients et les tests à domicile. La figure suivante présente un aperçu des techniques de détection de pathogènes s'appuyant sur la microfluidique.

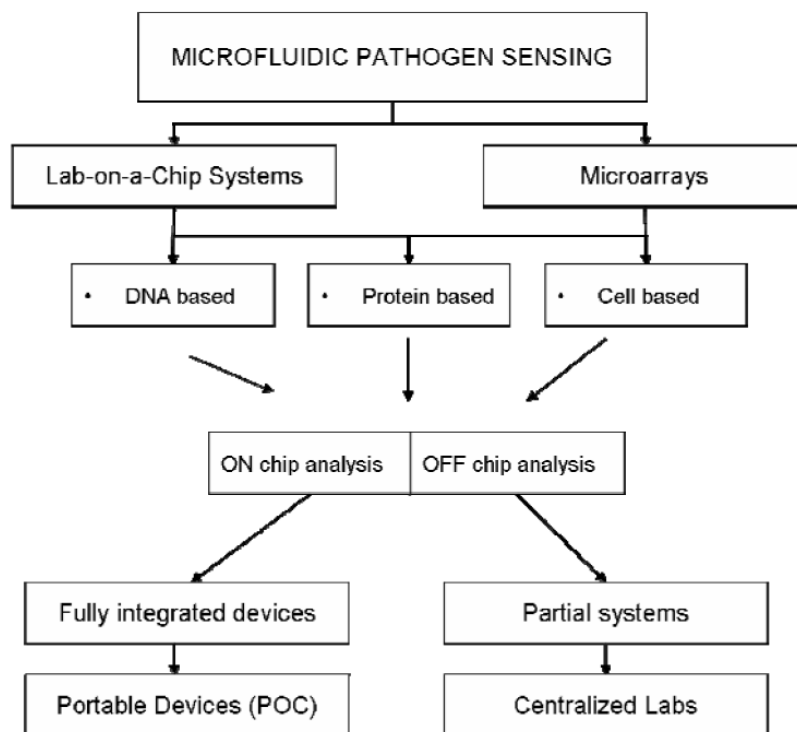


Figure III. 5 Aperçu schématique des systèmes de détections de pathogènes s'appuyant sur la microfluidique.

III.3.2. Techniques de fabrication des dispositifs microfluidiques intégrés aux laboratoires sur puce

La plupart des techniques de fabrication des biopuces microfluidiques a été développée dans l'industrie des semiconducteurs (T. Vilkner *et al.* , 2004). En conséquence, la propriété commune aux biocapteurs et aux systèmes microfluidiques est l'utilisation des procédés de photolithographie pour leur fabrication et des substrats comme le silicium, le verre ou encore le quartz sont utilisés (C-D. Chin *et al.* , 2007). L'avantage majeur des technologies sur puce est la miniaturisation car elle offre des capacités innovantes et une meilleure performance par rapport aux technologies courantes. Par exemple, la manipulation de volumes de l'ordre du pico ou nanolitre à la surface de puces en silicium a conduit à la fabrication de microréacteurs chimiques et à l'amélioration des seuils de détections (D.M. Morens *et al.* , 2004). Au fil des ans, une variété de matériaux a été utilisée pour la microfabrication en microfluidique comme le verre, le silicium, les polymères (durs et mous) ou des biomatériaux comme le Calcium alginate, les hydrogels et la gélatine réticulée (E.T. Lagally *et al.* , 2000). Toutefois, une tendance récente évolue vers des technologies de microfabrication à base de polymères, dans un effort de minimisation des couts des systèmes microfluidiques (G.M. Whitesides *et al.* , 2003). C'est également le cas pour les systèmes de détection de pathogènes, où la plupart des applications requièrent des systèmes jetables afin d'éliminer la contamination croisée. En général, les matériaux polymères de choix sont ceux qui résistent aux solvants comme le Teflon® ou les élastomères silicon photomodelables, les polyesters, les poly(méthylmethacrylate) (PMMA), le PDMS imprimé et les polymères polyimide et SU8 (négatifs et positifs) (C. Ionescu-Zanetti *et al.* , 2005) (H. Becker *et al.* , 2008) (R. Mukhopadhyay *et al.* , 2007).

Le challenge des dispositifs microfluidiques à base de polymères comprend la minimisation des variations d'un lot à un autre, l'amélioration de leur résistance chimique, le contrôle de la chimie de surface et la compatibilité avec la fluorescence. Il est tout aussi important de noter qu'une variété d'opérations doit être réalisée sur les laboratoires sur puce, comme le prétraitement des échantillons adapté à la source des fluides physiologiques (le sang, l'urine, la salive), l'actionnement fluide, le contrôle (mélange) et la détection du signal. De plus, il y a des risques liés au transport dans différents environnements qui doivent être considérés comme les changements de températures et le taux d'humidité élevé (P. Abgrall *et al.* , 2007).

Les méthodes de détection analytiques ont pratiquement toutes été intégrées ou associées avec succès à des dispositifs sous forme de laboratoires sur puce ; celles-ci comprennent les détecteurs optiques, électrochimiques, les capteurs magnéto-résistifs (GMR), acoustiques et les capteurs spectrométriques de masse (MS) ainsi que les capteurs à résonance magnétiques nucléaire (NMR).

Comme exemple nous pouvons citer le travail de P. Ortiz *et al.* qui ont développé et fonctionnalisé un résonateur circulaire avec des anticorps. Un système microfluidique est associé au dispositif formant ainsi un biocapteur pour la détection de différents biomarqueurs de cancer (P. Ortiz *et al.* , 2008).

III.3.3. Laboratoires sur puces commerciaux pour la détection de pathogènes

Compte tenu du besoin urgent de la détection rapide de pathogènes, une variété d'outils commerciaux ont été développés pour relever les défis actuels du diagnostic médical. Nous avons listé ci-dessous différentes compagnies ayant développé des systèmes de détection de pathogènes intégrant un réseau microfluidique s'appuyant sur diverses méthodes. Par exemple, le biocapteur "Cellular Analysis And Notification of Antigen Risks and Yield" (CANARY), basé sur la détection d'antigène, est capable de détecter rapidement et de manière efficace une variété de pathogènes à de faibles niveaux (T.H. Rider *et al.* , 2003). En outre, les biocapteurs SPR sont actuellement implémentés pour être appliqués au déploiement spécifique pour la détection de molécules, de protéines, de virus et de microbes en utilisant le capteur SPREETA (Sensata) (T.M. Chinowsky *et al.*, 2003). Invitrogen a développé un dispositif pour "Multi Agent Portable Pathogen Detection System" (MAPP-DS) basé sur un test immunologique unique et multiplexé. Des protocoles de détection de staphylocoques comme le *Bacillus anthracis* et le *Bacillus subtilis*, l'enterotoxine B, la toxine A botulinum Clostridium et la ricine sont également disponibles. Selon les fabricants, les seuils de détection de ces dispositifs sont généralement meilleurs que les tests ELISA. Le Tableau III. 1 montre clairement que la plupart des technologies de détection de pathogènes s'appuient sur l'ADN.

Tableau III. 1 Les systèmes fluidiques commerciaux pour la détection de pathogènes

Compagnies	Molécule cible	Site Web
Advanced Liquide Logics	Anticorps	www.liquid-logic.com
Cepheid	ADN	www.cepheid.com
CombiMatrix CustomArray	ADN, biological threads	www.combimatrix.com
Invitrogen	ADN	www.invitrogen.com
Affymetrix	ADN	www.affymetrix.com
Caliper	ADN	www.caliperls.com
Febit	ADN /ARN/Protéines	www.febit.com
Claros Diagnostics	Protéines	www.clarosdx.com
HandyLab	ADN, protéines	www.handylab.com
Abbott Diagnostics (iStat)	Marqueurs	www.istat.com
LabNow	HIV/SIDA	www.labnow.com
Micronics	Pathogènes entériques	www.micronics.net
Nanogen	ADN /ARN	www.nanogen.com
Nanosphere	ADN, protéines	www.nanosphere-inc.com
Sensata (Spreeta)	Virus, bactéries	www.sensata.com
Sequella	Protéines	www.sequella.com
BIAcore	Bactéries, virus	www.biachore.com
Canary	Lymphocytes B	www.canarysystem.com
Rapid Plex (ICx Biosystems)	Bactéries, protéines	www.inivtrogen.com

Leur développement a été facilité par l'intégration de la microfluidique dans le domaine de la recherche en génomique. Toutefois, la commercialisation d'une large gamme de puces de

détection s'appuyant sur les protéines intégrant un réseau microfluidique est à prévoir dans un avenir proche.

III.4. Banc de mesure expérimental

Afin de réaliser les mesures de détection d'analogues de nucléosides en temps réel nous avons mis en place un banc de mesure dédié. Celui-ci comprend :

- une cellule de mesure;
- un ordinateur d'acquisition pour les fréquences;
- un montage électronique de conditionnement pour oscillateurs;
- un système d'injection microfluidique

Dans ce qui suit nous allons exposer les méthodes de conception et de réalisation d'architectures des puces en PDMS pour la mise en œuvre des protocoles hydrodynamiques d'utilisation du capteur à ondes de Love. La cellule de mesure, le système d'injection microfluidique ainsi que le système électronique de conditionnement seront également détaillés.

III.4.1. Conception et réalisation des puces PDMS microfluidiques

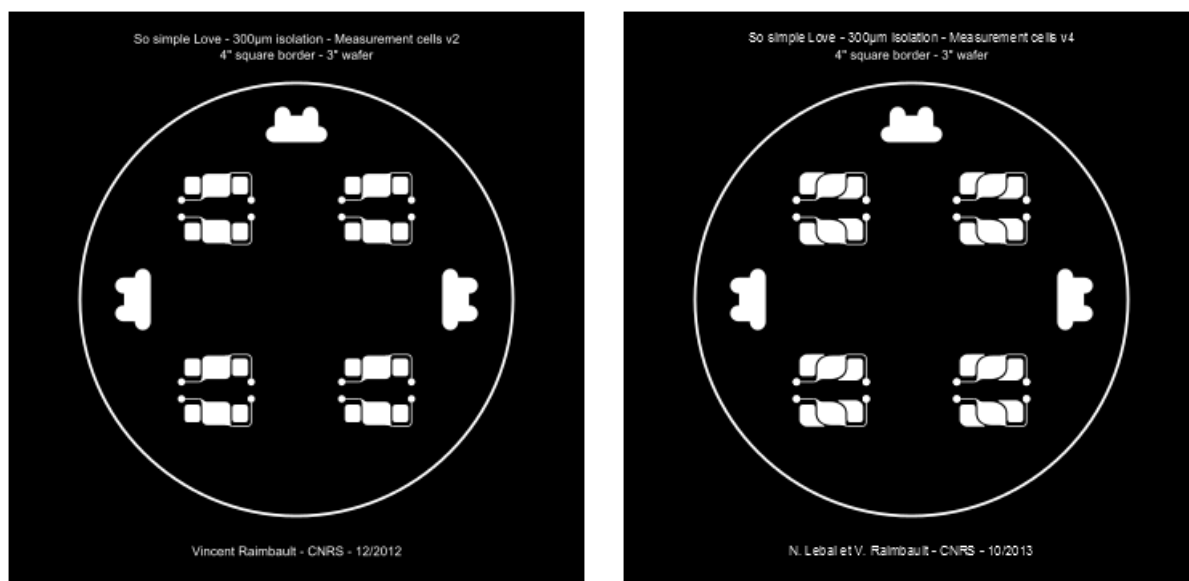
La mise en œuvre des protocoles hydrodynamiques (liquide en mouvement dans la chambre d'analyse) d'utilisation du capteur à ondes de Love a nécessité la réalisation de puces microfluidiques afin de réduire le volume des solutions à analyser et de limiter la surface de contact du liquide avec le capteur à la zone du chemin de propagation de l'onde acoustique. Notre choix s'est porté sur le PDMS en raison de ses propriétés chimiques et physiques et des multiples avantages qu'il présente, en plus d'une utilisation déjà répandue dans ces domaines aujourd'hui.

D'un point de vue technologique, la possibilité de fabriquer des composants fluidiques, et ce en quelques heures, sans pour autant requérir un environnement de salle blanche, rend le PDMS très attrayant. De plus, celui-ci présente de nombreux avantages découlant de ses propriétés intrinsèques. En effet le PDMS est biocompatible (M.C. Belanger *et al.*, 2001), peu coûteux et transparent (240nm-1100nm), il peut être préparé de manière à reproduire des formes avec une résolution de l'ordre de quelques nanomètres (F. Hua *et al.*, 2004). Les

répliques PDMS peuvent être ainsi fixées de manière covalente à des substrats en verre en utilisant un simple traitement plasma pour former des chambres microfluidiques scellées.

III.4.1.1. Motif des chambres d'analyse des puces microfluidiques

Les dessins des négatifs ont été conçus sur © Inkscape et imprimés sur films transparents avec une résolution de 5000 DPI par impression sur flasheuse monochrome. Des exemples du masque utilisé pour reproduire le motif sur le wafer sont représentés sur la Figure III. 6. Un motif a été imaginé en modifiant les contours du motif existant afin de privilégier une circulation optimale des liquides. En effet, les contours arrondis du nouveau motif de la Figure III. 7 facilitent le remplissage de la chambre microfluidique et limitent ainsi la formation des bulles d'air qui constituent un problème sérieux lors de la détection en milieu liquide d'autant plus, dans notre cas, pour une mise en œuvre par pression et non par adhésion sur le capteur afin de préserver l'accessibilité de la surface.



(a)

(b)

Figure III. 6 Masque avec les motifs des chambres fluidiques à reproduire sur un « Wafer » de silicium (3 pouces de diamètre et 1000 μm d'épaisseur) avec motifs microfluidiques en SU8. (a) ancien motif, (b) motif avec contours adoucis.

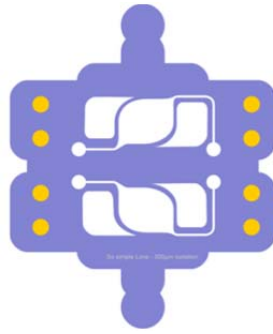


Figure III. 7 Motif microfluidique 2D avec contours arrondis

Nous nous sommes inspirés du protocole détaillé dans la *datasheet* de la SU-8 3000 de Micro.Chem, pour la réalisation des motifs en résine négative SU-8 3050. Les substrats silicium, de 3 pouces de diamètre et 1000 μm d'épaisseur, sont d'abord nettoyés à l'acétone et à l'isopropanol ou l'éthanol, puis chauffés pendant 20 minutes. La résine est ensuite déposée sur le wafer, à l'aide de la tournette programmable, couvercle fermé. La vitesse et le temps de rotation sont fonction de l'épaisseur de résine désirée : pour obtenir une épaisseur de 200 μm , 2000 tours/min pendant 80 secondes. À la fin du cycle de rotation, le wafer est porté une première fois à 95 °C pendant 40 minutes sur une plaque chauffante programmable (de 25°C à 95°C avec une rampe de 5°C par minute, puis 40 minutes lorsque la consigne de 95°C est atteinte). Après refroidissement de la résine à rampe contrôlée pour éviter tout stress thermique pouvant générer des craquelures, voire des décollements de la résine, le wafer et le film transparent comportant les négatifs des motifs microfluidiques sont positionnés dans l'insoleuse UV, pour une insolation de 25 s. Le wafer est ensuite chauffé une seconde fois à (65°C pendant 10 minutes et à 95° pendant 15 min) et placé dans un bain de révélateur pour faire apparaître les motifs. La durée de révélation est de 16 minutes. Dès que l'étape de révélation est terminée, le wafer est nettoyé à l'acétone puis à l'isopropanol avant stockage.

III.4.1.2. Le moule des puces microfluidiques

Pour la fabrication et le prototypage rapide des puces en PDMS, nous avons utilisé un moule développé dans le cadre de la thèse de Hakim Tarbague (H. Tarbague, 2011) permettant d'obtenir des puces PDMS à architectures tridimensionnelles calibrées, prédécoupées, et ajustables sur le capteur ; ces caractéristiques sont essentielles pour obtenir une bonne répétabilité des conditions de tests (température et pression). Ce procédé de fabrication des puces PDMS a été choisi pour sa grande polyvalence dans la réalisation de prototypes. Le moule est en aluminium du fait de son usinage aisé et de sa faible affinité avec le PDMS facilitant le démoulage.

Le moule utilisé pour la confection des puces microfluidiques dédiées au régime hydrodynamique, présenté en suivant, permet de réaliser simultanément quatre puces PDMS comportant des réseaux microfluidiques. Ce moule représenté en vue éclatée sur la Figure III. 8 et photographié en Figure III. 9 comporte plusieurs éléments superposés :

- une base en aluminium, prévue pour accueillir un wafer de 3 pouces de diamètre et de 1000 μm d'épaisseur comportant les motifs microfluidiques, décrits plus loin ;
- une pièce centrale, en aluminium, délimitant les formes extérieures des puces ;
- un élément de répartition (« dispatcheur »), en aluminium, permettant la diffusion du PDMS dans les différentes cavités lors de l'injection ;
- un couvercle, en aluminium, comportant des tiges métalliques serties (non représentées) permettant d'aménager les accès pour les fluides ainsi que les passages pour les pointes de contact à ressort de la cellule de test à travers la puce de PDMS.

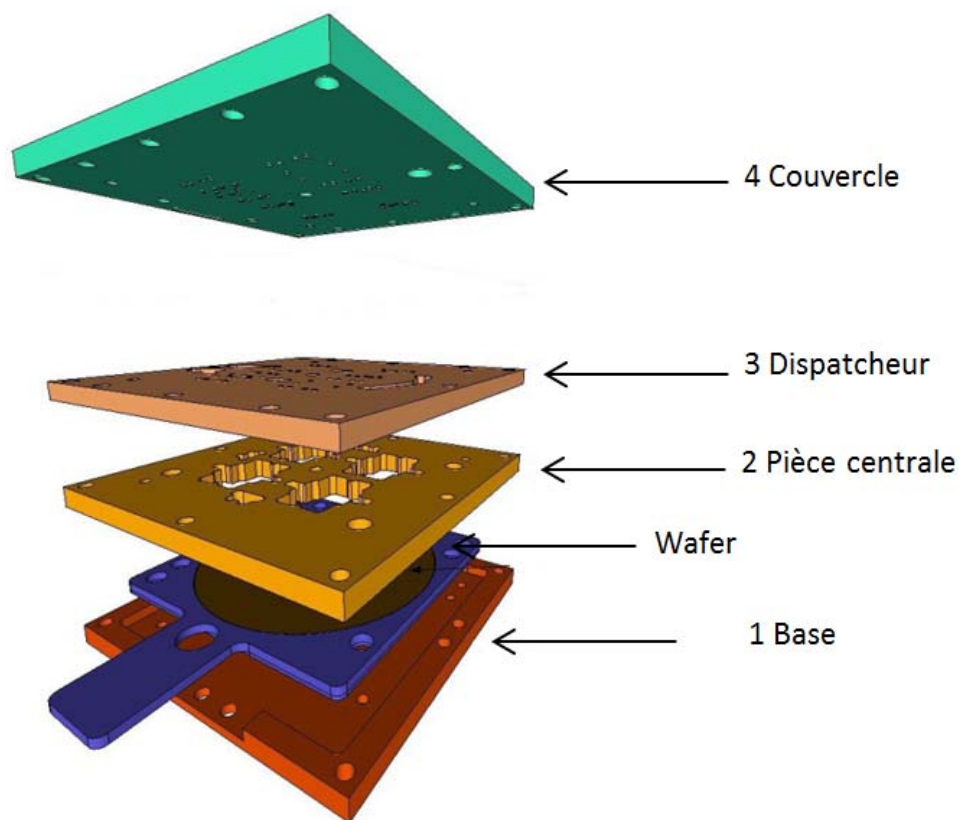


Figure III. 8 Vue éclatée du moule en aluminium

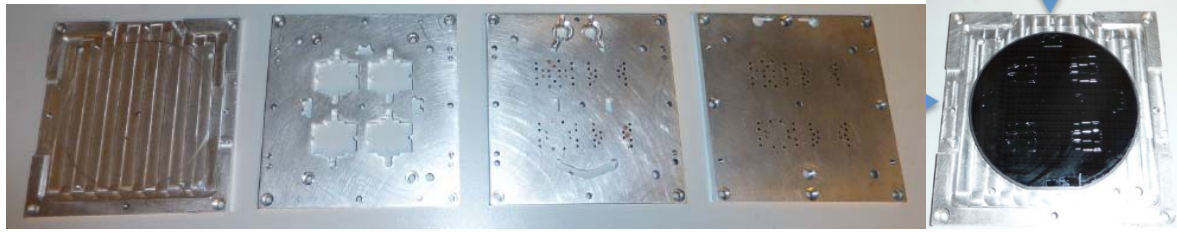


Figure III. 9 Photographie des parties du moule en aluminium : de gauche à droite 1) la base, 2) la pièce centrale, 3) le dispatcheur 4) le couvercle et 5) le wafer en silicium avec les motifs en SU8 logé dans la base.

Le PDMS Sylgard 184 se présente sous la forme de deux composants, une base et un agent réticulant, qui sont à mélanger puis à dégazer avant de pouvoir être utilisés. Le taux est généralement de 10:1 (Base: Réticulant). 30g de la base est versée dans un gobelet en plastique, est ajouté 1/10 de réticulant à l'aide d'une pipette jetable, soit dans notre cas 3 g. Un mélange à l'aide d'une spatule permet d'obtenir une bonne homogénéité, complétée par un dégazage du PDMS jusqu'à la disparition des bulles.

Ainsi, le wafer de silicium préparé dans la partie précédente est inséré dans la base du moule en aluminium (Figure III. 9 (6)). Le wafer permet de définir les structures internes des puces PDMS, à partir de motifs en résine SU8 négative révélés à sa surface. Cette association permet de concilier une structure mécanique tridimensionnelle, à une structure microfluidique de bonne résolution, aisément prototypable. La partie centrale (Figure III. 9 (2)) du moule est placée au-dessus de la base et maintenue grâce à des vis et des piges d'alignement. Une fois les vis serrées, 2 à 3 mm du PDMS dégazé est versé dans chacune des 4 cellules. Le reste du PDMS dégazé est versé dans une seringue. Celle-ci ainsi que l'ensemble précédent sont placés dans une cloche à vide pour un nouveau dégazage pendant 5 min suivi d'une vérification d'absence de bulles. La seconde partie du moule comprenant le dispatcheur (Figure III. 9 (3)) et le couvercle (Figure III. 9 (4)) est associée et placée sur la première partie en enfonçant légèrement les piges pour garantir un bon alignement des pièces, puis l'ensemble est vissé (serrage en diagonale). Les forêts sont positionnés dans les trous prévus à cet effet jusqu'à être en contact avec le wafer. Lorsque toutes les piges sont correctement insérées, le moule est placé horizontalement sur une plaque chauffante à 95° C pendant 15 min afin de réticuler la première couche de PDMS en contact avec les motifs. Pendant 5 à 10 minutes de refroidissement, la seringue est préparée en s'assurant qu'il n'y ait pas de bulles d'air en sortie. Le moule tenu à la verticale, l'embout de seringue est vissé dans le port d'injection, vers le haut. Le PDMS est injecté grâce à un embout Luer et une connectique vissée sur la seringue. Cette étape est difficile car la pression à exercer est très importante.

Lorsque le PDMS déborde des orifices, l'injection est arrêtée, la seringue enlevée et remplacée par un bouchon. Le moule est toujours placé à la verticale, sur la plaque chauffante pendant 2h30 à 95°C. Une fois le moule refroidi, les différentes parties du moule sont séparées et les puces PDMS libérées. Toutes ces étapes sont détaillées et illustrées dans le tutoriel de préparation des puces PDMS.

Une photographie de la puce PDMS obtenue par ce protocole est représentée dans la Figure III. 10 (a). Cette cellule comporte deux chambres d'analyse (pour les deux lignes à retard du capteur à onde de Love) et des cavités d'air afin de protéger les transducteurs. L'épaisseur très faible du réseau microfluidique ($\sim 200\mu\text{m}$) permet de confiner le liquide à la surface du capteur (cf. Figure III. 10).

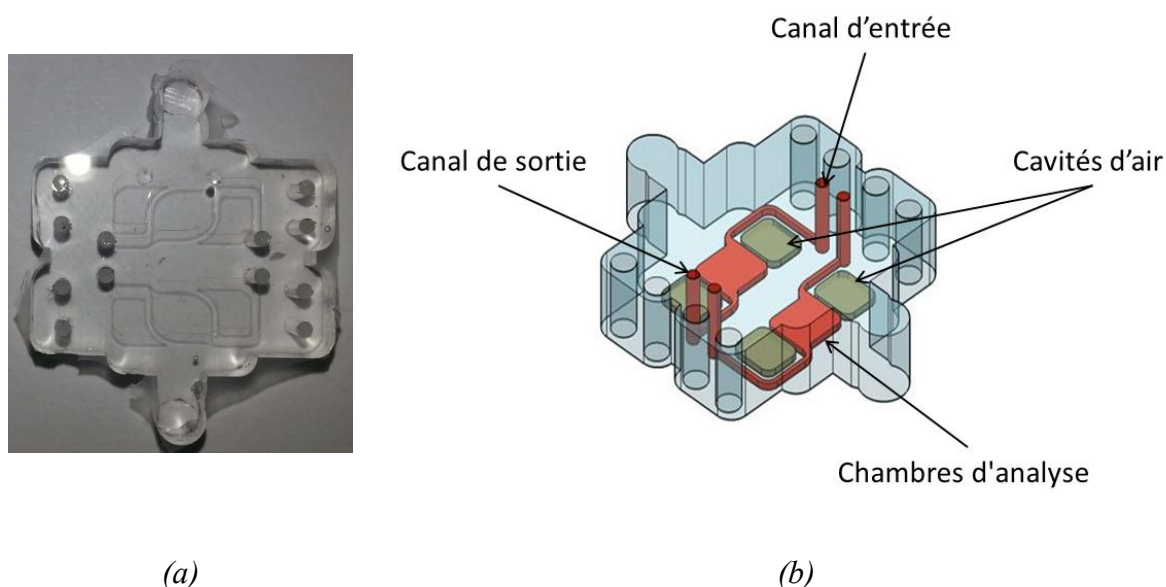


Figure III. 10 La puce microfluidique en PDMS : (a) photographie de la puce démoulée, (b) image 3D sous Inkscape

III.4.1.3. Tests de compatibilité de la puce PDMS avec les solutions utilisées pour les mesures

La sorption de différentes solutions par le PDMS a été testée, pour vérifier la compatibilité du PDMS avec les différents produits requis pour le protocole de recapture des nucléotides. Les solutions que nous avons souhaité tester sont les solutions tampon ((acide acétique/hydroxylamine). 1mM PH 7) et la solution d'extraction ((Ammoniaque/méthanol) (70/30) v/v). Pour ce faire, nous nous sommes inspirés du protocole expérimental de (F. Vilaplana *et al.* , 2004) qui ont testé la sorption du PDMS dans divers solvants.

Pour cela nous avons coulé du PDMS dans des boîtes de pétri afin d'obtenir des disques que nous avons découpés en échantillons rectangulaires (longueur 20mm × largeur 20 mm). Les dimensions des échantillons ont été mesurées avec un pied à coulisse en considérant la moyenne comme valeur finale. Ils ont été disposés sur une plaque chauffante à 65° C pendant 4 heures et leur masse a été mesurée par la suite (cf. Tableau III. 2). Les échantillons sont ensuite immergés dans les différentes solutions de test maintenues à une température fixe de 40° C à l'intérieur d'un banc thermostatique. Les échantillons sont retirés périodiquement et sont essuyés avec des lingettes de salle blanche pour éliminer les traces de liquide à leur surface avant de mesurer leur masse. La fréquence de mesure diminue au fur et à mesure du temps (chaque 5 minutes, ensuite chaque 10 minutes...) (F. Vilaplana *et al.*, 2004).

Tableau III. 2 Dimensions et masse des échantillons PDMS

<i>Echantillon</i>	<i>Longueur (mm)</i>	<i>Largeur (mm)</i>	<i>Epaisseur (mm)</i>	<i>Poids à sec (g)</i>
1	20	20	3.17	1.3370
2	20	20	3.44	1.4009

Les résultats du Tableau III. 3 montrent qu'il n'y a aucun effet notable des solutions tampon et de recapture sur le poids des échantillons même après 19h d'exposition. Par ailleurs les dimensions des échantillons ont été mesurées à la fin du protocole expérimental et aucun changement n'a été enregistré.

Tableau III. 3 Evolution au cours du temps du poids des échantillons PDMS plongés dans les solutions de test

	<i>Poids échantillon1(g)</i>	<i>Poids échantillon2 (g)</i>
<i>Temps</i>	<i>Solution Acide acétique/ hydroxylamine</i>	<i>Solution Ammoniaque/Méthanol</i>
5 min	1.3370	1.4030
10 min	1.3380	1.4024
15 min	1.3374	1.4073
20 min	1.3372	1.4019
25 min	1.3374	1.4024
35 min	1.3375	1.4019
45 min	1.3364	1.4198
55 min	1.3370	1.4028
1h 5 min	1.3374	1.4031
2h 5 min	1.3360	1.5336
18h 51 min	1.3623	1.4860

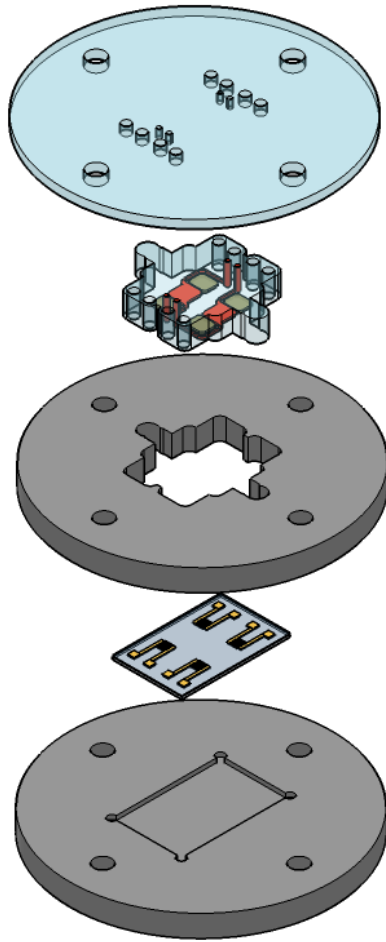
III.4.2. Cellule de test adaptée aux puces PDMS

Une cellule de mesure a été conçue pour l'utilisation de ces puces, celle-ci est a été adaptée par Vincent Raimbault (CR CNRS) et Jean-Luc Lachaud (Ingénieur d'Etude) d'une cellule de test PHD2 développée lors des travaux de thèse de Hakim Tarbague. Cette nouvelle cellule de mesure, pour laquelle modularité, facilité d'utilisation et robustesse ont été privilégiées (vue éclatée en Figure III. 11 (a)) est constituée de trois pièces en aluminium et une autre en plexiglas.

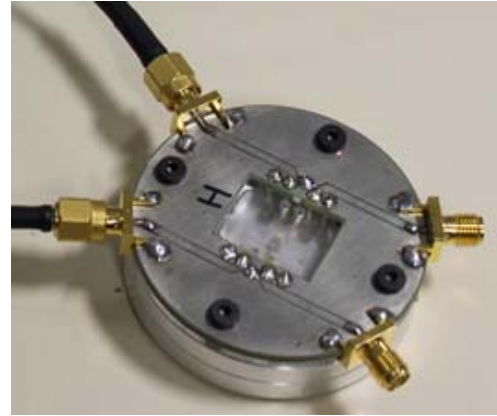
- La base en aluminium, mise au point pour contenir le capteur
- La puce PDMS

- Le bloc de calibration en aluminium permet le calibrage de la hauteur et du taux de compression des puces PDMS de test.
- Le bloc de connexions, est équipé de connecteurs SMA vissés pour une meilleure tenue mécanique dans le temps, et de pointes de touche à ressort Figure III. 11 (b)) .
- Le couvercle en plexiglas fixé sous le bloc de connexions SMA assure le maintien avec une pression homogène contrôlée de la puce de PDMS sur le capteur, tout en autorisant la visibilité de l'écoulement.

Le capteur est placé au fond de la première pièce en aluminium où se trouve une chambre usinée dont les dimensions dépassent de quelques micromètres les dimensions de la ligne à retard. La deuxième pièce vient s'aligner sur la première grâce à des mires d'alignement. La puce PDMS microfluidique est insérée ensuite au centre de la cellule. Enfin la pièce en plexiglas est imbriquée dans la dernière cellule en aluminium, les *pogo pins* (pointes de touche à ressort) soudées à cette dernière sont ainsi enfoncés dans la cellule microfluidique à travers des canaux prévus à cet effet afin d'assurer le contact avec les accès en or du capteur. L'ensemble des pièces et la puce microfluidique est ainsi maintenu par pression au-dessus du capteur grâce à des vis. La réversibilité de cette configuration à savoir la possibilité de démonter la puce fluidique confère à cette méthode de maintien par pression un grand avantage contrairement aux configurations classiques où la puce PDMS est collée sur le capteur de manière définitive. La transparence de la puce fluidique en PDMS d'une part et de la plaque en plexiglas permet un contrôle visuel de la chambre d'analyse. Le serrage des vis constitue une étape importante, tout en assurant l'étanchéité de la chambre fluidique, celle-ci ne doit pas atténuer l'onde acoustique qui se propage à la surface du capteur. L'usage d'un tournevis dynamométrique à déclenchement permet de contrôler le couple de serrage et d'assurer une reproductibilité rigoureuse des mesures. La valeur du couple appliquée pour le serrage dépend des vis mais également de l'épaisseur du dépôt.



(a)



(b)

Figure III. 11 La cellule de mesure avec la puce PDMS et le capteur : (a) Vue éclatée de la cellule (b) photographie de la cellule vissée avec le couvercle et les connecteurs SMA

Nous avons effectué des tests d'écoulements avec cette puce maintenue par pression au-dessus d'un capteur au sein de la cellule de test. Ces tests avec des débits allant de $1\mu\text{L}/\text{min}$ à $25\mu\text{L}/\text{min}$ ont prouvé que l'architecture microfluidique des puces PDMS réalisées et décrites précédemment facilite les écoulements en évitant les zones mortes (zones au sein desquelles le liquide ne circule pas après remplissage initial).

III.4.3. Système d'injection microfluidique

III.4.3.1. Les pousse-seringues

La microfluidique implique l'utilisation de faibles débits et dans la plupart des cas, des systèmes adaptés fabriqués grâce aux technologies polymères (PDMS). Cet environnement

très particulier accentue les effets indésirables des pousse-seringues (cf. Figure III. 12) que les utilisateurs arrivent généralement à gérer. Dans ce qui suit, nous présenterons un aperçu des pousse-seringues utilisées en microfluidique, leurs avantages, leurs inconvénients ainsi que les compromis à faire selon les objectifs et le budget.

III.4.3.2. Les avantages des pousse-seringues pour les applications microfluidiques

L'avantage majeur des pousse-seringues est leur facilité d'utilisation. Lorsqu'il est couplé à un logiciel, cet instrument peut être programmé facilement afin de réaliser des séquences de débits. Un autre avantage des pousse-seringues est leur capacité à générer des pressions assez élevées de l'ordre de centaines de bars si cela est nécessaire afin d'atteindre la consigne du débit imposé. Pour quelques applications spécifiques comme la nanofluidique, cette pression élevée est nécessaire pour l'injection.



Figure III. 12 Pousse-seringue modèle NE-1000 de New Era

III.4.3.3. Les inconvénients des pousse-seringues pour les applications microfluidiques

Les déplacements du moteur des pousse-seringues ne sont pas parfaitement liés au mouvement du fluide car il y a une influence du système connecté. Même si la différence est faible, elle peut rapidement engendrer des effets sévères sur le débit réel notamment dans le cas d'une configuration microfluidique. Cet effet reste important pour les pousse-seringues en général mais peut être négligé pour des pousse-seringues microfluidiques de haute

performance comme ceux de Nemesys de chez Cetoni. Un autre inconvénient des pousses seringues se présente lorsqu'on tente d'atteindre un débit, l'appareil peut accumuler une pression supérieure à quelques centaines de bar dans le système microfluidique. Ces pressions élevées ne sont pas toujours compatibles avec tous les systèmes et peuvent causer des détériorations. Nous pouvons citer comme exemple l'obstruction des sorties des puces PDMS par des particules qui peut entraîner l'éclatement de celle-ci.

La majeure différence entre le débit théorique et réel est liée à la réponse du système. Cet effet est inhérent à la technologie des pousse-seringues et ne dépend pas de sa qualité. Un système fluidique oppose toujours une certaine résistance qui conduit à une accumulation de pression. Une autre différence entre le débit réel et le débit théorique provient du pas minimal du moteur. Cette limitation mécanique est visible uniquement à de faibles vitesses car elle rend les mouvements du moteur non continus ce qui engendre ainsi des impulsions dans le débit. Selon la qualité du pousse-seringue, cet inconvénient est plus ou moins visible. Il est toutefois difficile en microfluidique de s'en départir lorsqu'on traite des débits inférieurs à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

III.4.4. Système d'injection régulé en pression Elveflow

Afin de nous affranchir de tous les inconvénients des pousses seringues et afin de pouvoir injecter plusieurs liquides en entrée de la puce microfluidique nous avons utilisé le système d'injection régulé en pression OB1 MKII d'Elveflow®. Ce système de contrôle de débit est conçu pour générer un flux stable et sans impulsions avec un faible temps de réponse. Il contrôle quatre voies indépendantes l'une de l'autre pour une large gamme d'applications microfluidiques.² Ce système offre des performances fluidiques supérieures comparé aux pousses-seringues et aux pompes péristaltiques, il délivre un débit régulier et assure une haute précision, car aucune partie mécanique n'est utilisée dans le processus de génération de la pression. Le système OB1 d'Elveflow® est contrôlé par un ordinateur via un port USB en utilisant une interface qui permet de créer et de contrôler en temps réel des profils de pressions complexes (sinus, carré, triangle, rampes, impulsion et signal en dent de scie). Cette interface permet également d'enregistrer et d'exporter les données de mesure générées par l'instrument Elveflow® connecté.

² [Consulté le 9 Février 2012]. Disponible à l'adresse : <http://www.elveflow.com/microfluidic-flow-control-products/pressure-controller>.

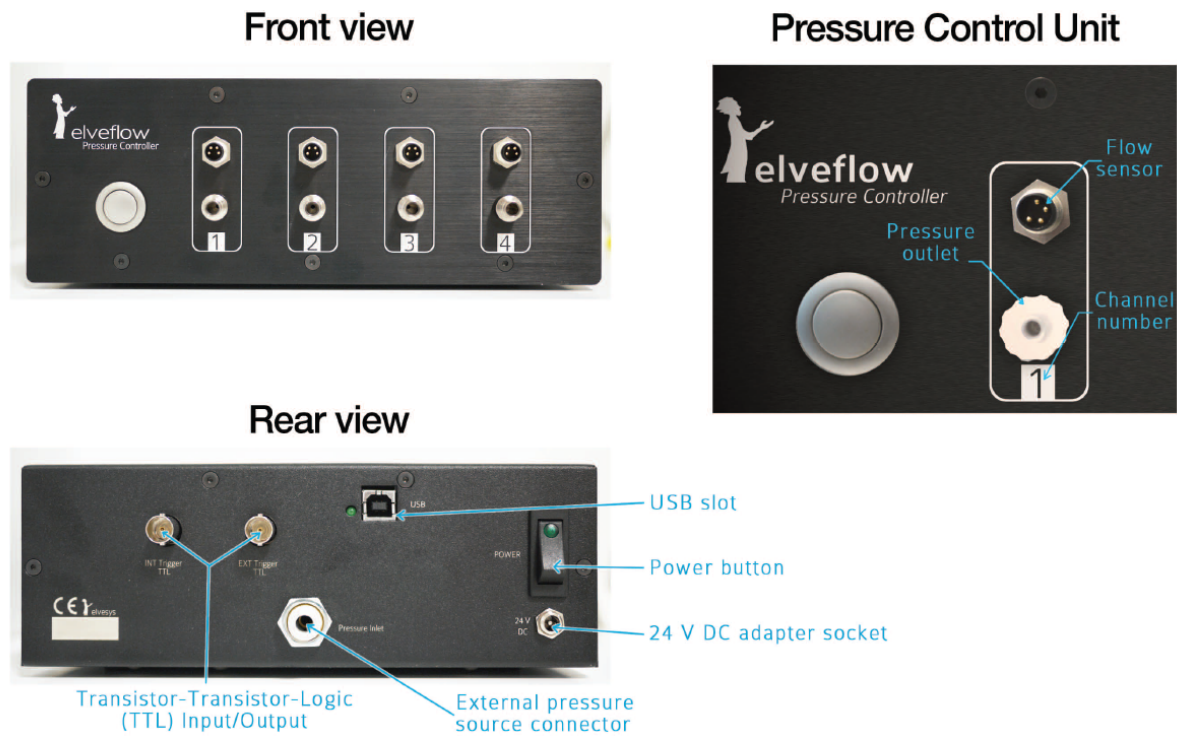


Figure III. 13 Différentes vues du système d'injection régulé en pression Elveflow®

Le principe de fonctionnement des réservoirs

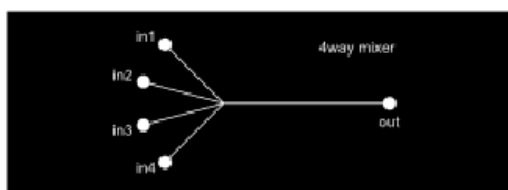
Le gaz contrôlé en pression émanant du système OB1 applique une pression à la surface du liquide contenue dans les réservoirs (cf. Figure III. 14). Par conséquent, le liquide va alors s'écouler en dehors du réservoir jusqu'à la sortie à travers le tube microfluidique plongé au fond du réservoir afin d'atteindre les canaux de la puce microfluidique.



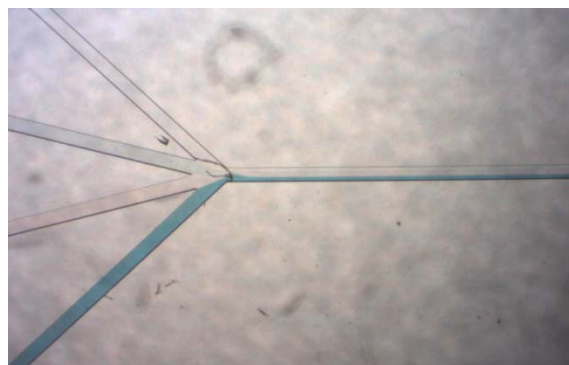
Figure III. 14 Photographie des réservoirs utilisés avec le système OBI

III.4.5. Multiplexeur microfluidique

Comme la puce microfluidique associée au capteur acoustique inséré dans la cellule de test ne possède qu'une seule entrée, nous avons élaboré une autre puce fluide en PDMS, réalisant la fonction d'un multiplexeur (*switch*) (cf. Figure III. 15). Cette puce permet de sélectionner entre les quatre liquides en sortie du système d'injection ELVEFLOW.



(a)



(b)

Figure III. 15 Multiplexeur microfluidique : (a) Masque avec les motifs du multiplexeur fluidique à reproduire sur un « Wafer » de silicium (3 pouces de diamètre et 1000 μm d'épaisseur) avec motifs microfluidiques en SU8 (b) photographie de la puce réalisée

La Figure III. 16 représente le synoptique du banc de mesure expérimental à base de pousse-seringues comme système d'injection. La sélection dans cette configuration se faisait par l'intermédiaire d'une vanne mécanique. Cette configuration a été remplacée par le nouveau système d'injection ELVEFLOW[®], où la sélection du liquide, via le multiplexeur, est réalisée par un réglage des débits au niveau de l'interface utilisateur ELVEFLOW[®]. La Figure III. 17 représente une illustration du banc de mesure final utilisé dans le cadre de nos travaux, dédiés à la détection d'analogues de nucléosides.

Dans cette configuration le liquide est injecté par le système ELVEFLOW[®] dans les réservoirs. L'un des réservoirs contient la solution de molécules cibles tandis que l'autre contient la solution tampon. Le liquide est sélectionné grâce au multiplexeur avant d'arriver dans les canaux de la puce microfluidique. Celle-ci est maintenue par pression à la surface du capteur et l'ensemble est inséré dans la cellule de test. Le liquide est ensuite évacué à l'extérieur de la chambre d'analyse microfluidique. La cellule de test est quant à elle, insérée dans la boucle d'oscillation du système électronique qui enregistre les variations de fréquences liées aux changements de masse ou autres effets mécaniques à la surface du capteur. Les courbes de variations de fréquences sont affichées en temps réel grâce à un PC qui contrôle également les débits d'injection dans le réseau microfluidique.

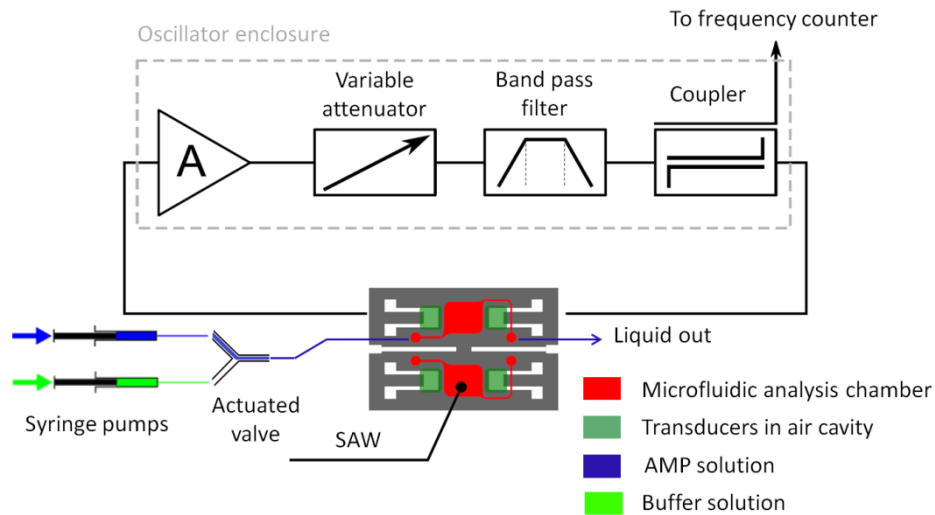


Figure III. 16 Description du dispositif expérimental. Deux pousse-seringues sont reliés à une vanne permettant la sélection du liquide à injecter dans la chambre fluïdique, un compteur de fréquence assure un suivi en temps réel de la fréquence.

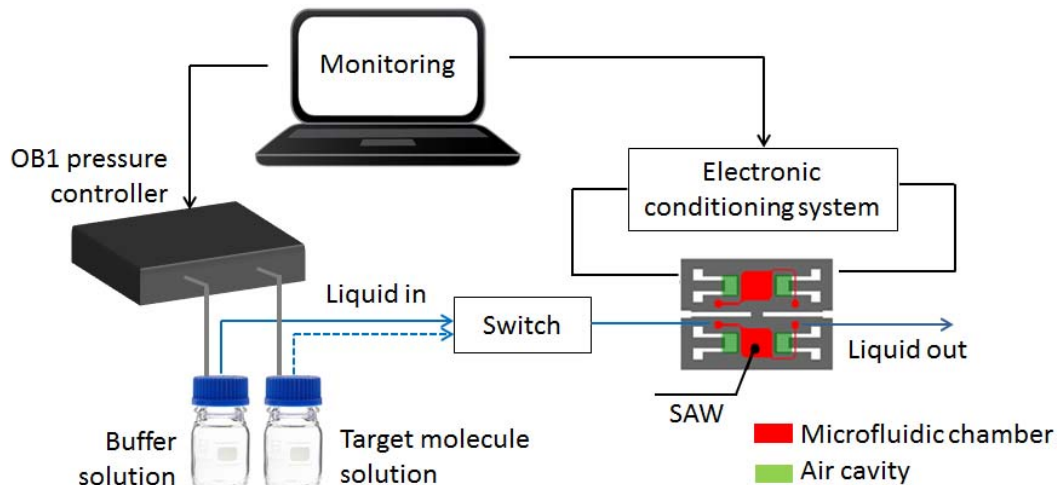


Figure III. 17 Description du banc de mesure pour la détection d'AMP en temps réel

III.5. Système électronique d'acquisition en temps réel

Dans le but d'utiliser les capteurs SAW en mode autonome (ambulatoire), nous avons également travaillé, d'une part, sur la conception d'un système permettant de faire l'acquisition et le traitement simultané de quatre signaux issus de capteurs SAW et d'en assurer la régulation en température, et d'autre part, sur la conception d'un véhicule de test qui intègre le capteur SAW et son électronique associée.

III.5.1. Système d'acquisition de données

Un prototype de fréquencesmètre a été réalisé selon le schéma ci-dessous et nous avons développé un programme permettant son pilotage par PC, grâce à une interface utilisateur, ainsi que l'acquisition des données que génère le système.

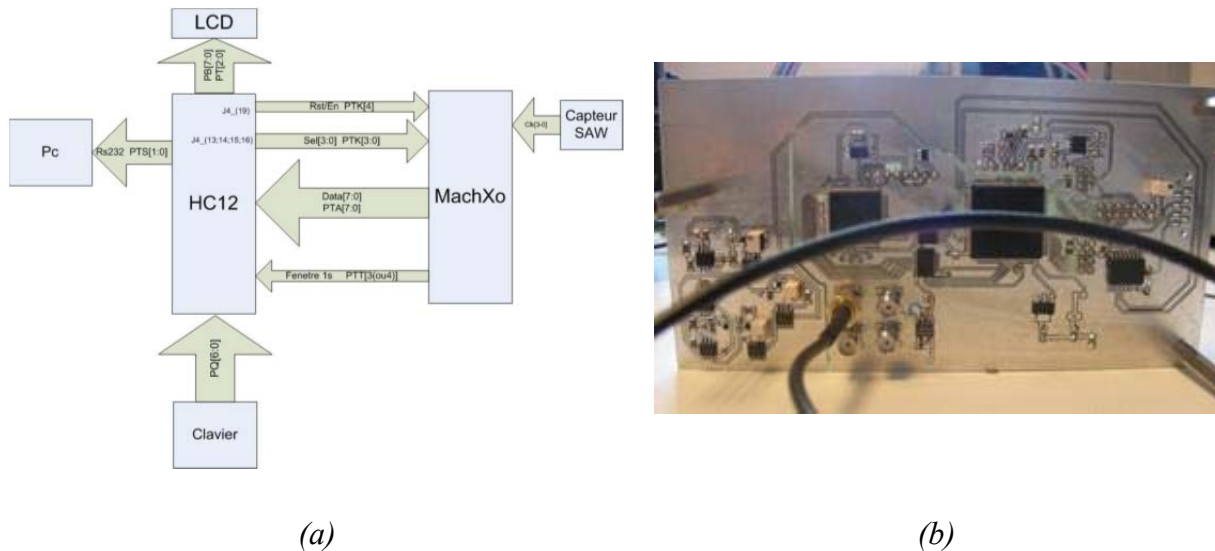


Figure III. 18 Synoptique (a) et photographie (b) de la carte d'acquisition des données.

Ce prototype et le logiciel de pilotage associé ont été testés et donnent satisfaction sur le plan de l'acquisition et de l'enregistrement des fréquences.

Une étude comparative des résultats de mesure d'un capteur en milieu microfluidique a été réalisée en laboratoire, d'une part, à l'aide d'un fréquencesmètre Agilent et d'autre part, à l'aide de notre carte prototype. Les courbes de mesures des fréquences sont représentées ci-dessous.

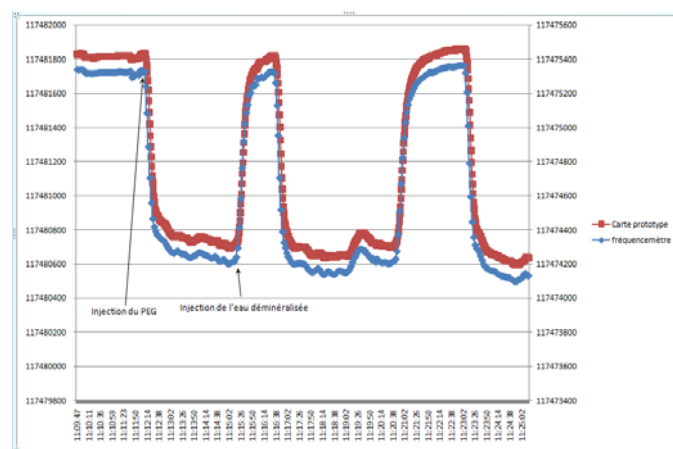


Figure III. 19 Réponses en fréquence en temps réel de capteurs : mesures comparatives avec deux systèmes de mesure de la fréquence (compteur Agilent et carte développée).

III.5.2. Véhicule de test

L'autre volet de cette étude concernait un prototype de véhicule de test incluant l'électronique de conditionnement du capteur. Le fonctionnement de ce véhicule de test (cf. Figure III. 20) a été vérifié avec une cellule microfluidique notamment en termes d'étanchéité. On a pu ainsi vérifier l'écoulement des fluides et les variations des fréquences du capteur.

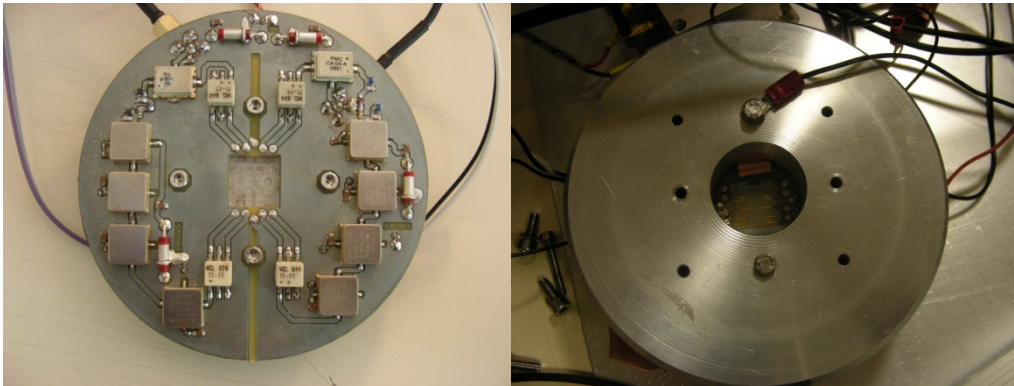


Figure III. 20 Photographie du dispositif intégrant l'électronique de conditionnement du capteur.

Cependant cette configuration présentait quelques aléas techniques. On peut citer à titre d'exemple, la mise en place des différents éléments et leur assemblage qui était assez délicate. Ceci impliquait de revoir la conception mécanique de l'ensemble. Par ailleurs, l'électronique de conditionnement semblait sensible aux bruits, il semblait alors intéressant d'affiner l'aspect Compatibilité Electro Magnétique (CEM).

Un autre problème que nous avons soulevé avec cette configuration multi électrodes utilisée en milieu liquide était le *cross-talk* qui apparaissait entre les deux lignes à retard conduisant à une perturbation des résultats. Ces phénomènes sont généralement contournés par des optimisations au niveau de l'architecture des contacts et pistes électriques (K.Seidler *et al.*, 2009).

III.6. Conclusion

Les dernières avancées, les applications commerciales ainsi que les nouvelles tendances des méthodes de détection de pathogènes associées à la microfluidique ont été abordées dans ce chapitre. La recherche en microfluidique pour le développement de laboratoires sur puce appliqués au domaine médical est encore jeune et en pleine expansion. Une variété de

matériaux et de méthodes de détection permettent de développer des dispositifs LOC rapides et peu coûteux pour le diagnostic au chevet du patient. Étant donné que les capteurs d'éléments pathogènes sous forme de laboratoires sur puces sont en compétition directe avec les technologies à l'échelle des laboratoires pour l'analyse des échantillons complexes, seuls les microdispositifs hautement intégrés (μ TAS) vont trouver des applications dans le monde réel. L'analyse des échantillons biologiques se traduit par plusieurs étapes de traitement, comme la préparation d'échantillons, la préconcentration, le marquage, l'amplification et la détection du signal. Dans l'ensemble, il n'y a que quelques μ TAS intégrant des systèmes microfluidiques qui ont été développés et qui sont capables de produire des résultats grâce à un seul et unique système, et ce à partir d'échantillons biologiques complexes (C. Easley *et al.* , 2006) (G.V. Kaigala *et al.* , 2006) (J.G. Lee *et al.* , 2006) (P. Gascoyne *et al.* , 2004).

Le grand nombre de publications dans des journaux scientifiques ayant un grand facteur d'impact et la disponibilité de dispositifs commerciaux sur le marché indiquent que les applications microfluidiques gagnent en importance. La tendance actuelle consiste ainsi à développer des outils de test à proximité des patients grâce à des dispositifs et des méthodes de diagnostic plus précis, rapides et portables.

Ce chapitre a également exposé les caractéristiques de la plateforme acoustique à onde de Love qui va servir de support de détection dans la suite de nos travaux. Nous avons élaboré un banc de mesure en vue de détecter les analogues de nucléosides en milieu liquide. Une puce microfluidique adaptée à notre application a été réalisée par lithographie douce. Cette puce est maintenue par pression à la surface du capteur et insérée dans une cellule de test que nous avons également détaillée. Des tests ont été réalisés afin de vérifier que l'architecture microfluidique des puces PDMS facilite les écoulements en évitant les zones mortes (zones au sein desquelles le liquide ne circule pas après remplissage initial).

L'ancien système d'injection à base de pousse-seringues a été remplacé par le nouveau système régulé par pression ELVEFLOW[®], conçu pour générer un flux stable et sans impulsions avec un faible temps de réponse. Nous avons par ailleurs réalisé un multiplexeur microfluidique pour sélectionner, via l'interface utilisateur ELVEFLOW[®], le liquide à injecter dans la chambre microfluidique à la surface de la zone de propagation du capteur.

Une fois le banc de mesures mis en œuvre, la prochaine étape consistait à greffer le polymère à empreintes moléculaires à la surface du capteur acoustique à ondes de Love. Dans le

chapitre suivant, différents dépôts de polymères à empreintes moléculaires à la surface du capteur acoustique seront étudiés.

IV. Mise au point du protocole de dépôt du polymère à empreintes moléculaire en couche mince

IV.1. Introduction

L'immobilisation de la couche sensible de détection à la surface du dispositif est un aspect important dans la réalisation d'un capteur intégré. L'objectif est d'obtenir un dispositif fonctionnel, reproductible et stable dans le temps. Le contact entre le dispositif et la couche MIP doit être le meilleur possible afin de limiter les effets parasites de l'environnement. L'adhésion à la surface du support est obtenue de manière covalente par réticulation de groupements sur le polymère et à la surface du support, appelé également le coating réactif. Nous avons opté pour la méthode de dépôt par spin-coating utilisée en technologie microélectronique pour l'étalement de la solution polymère (monomères, réticulant, molécule cible, solvant).

Ce chapitre est consacré à l'adaptation d'un protocole de MIP volumique en couche mince pour l'intégrer à la surface du capteur acoustique. Les traitements de surface nécessaires pour greffer le polymère de manière covalente seront détaillés. Nous exposerons également les caractérisations électriques des dispositifs après l'étape de dépôt pour valider la propagation de l'onde. Par ailleurs, l'état de surface des films et leurs épaisseurs seront étudiés par profilométrie mécanique et optique ainsi que par microscopie électronique à balayage. Une fois ce protocole validé, nous l'appliquerons à d'autres polymères pour la détection de pseudouridine et de 8-OHdG.

IV.2. Dépôt de couches minces du MIP pour la détection d'AMP

Nous avons opté pour une stratégie d'impression en surface où les sites de reconnaissance sont localisés ou sont très proches de la surface du polymère. Ceci est réalisé en synthétisant un polymère en couche mince à partir de la technique d'impression volumique (*bulk*). Cette méthode facilite la diffusion des macromolécules à travers la matrice polymère minimisant ainsi les inconvénients de la taille de la molécule empreinte. En outre, la technique d'impression des MIP en surface est physiquement plus robuste grâce à la présence du support et permet une intégration plus facile à des plateformes de détection. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique est la diminution de la spécificité puisqu'il n'y a

parfois qu'une partie de la molécule qui est imprimée. Plusieurs études utilisant cette approche ont été publiées (D.R. Kryscio *et al.*, 2012). Dans ce qui suit, les opérations technologiques du protocole de dépôt sont détaillées.

IV.2.1. Protocole de dépôt : Description des opérations technologiques

IV.2.1.1. Nature du substrat

Le substrat sur lequel les dépôts de polymères à empreintes moléculaires seront réalisés est un capteur acoustique à onde de Love de 24 mm de longueur, 15 mm de largeur et 0.1 mm d'épaisseur représenté dans la Figure IV. 1. Il est formé d'un substrat en Quartz, d'une couche guidante en SiO₂. Celui-ci comprend également des transducteurs interdigités (IDTs). Le dispositif est détaillé dans le chapitre III.

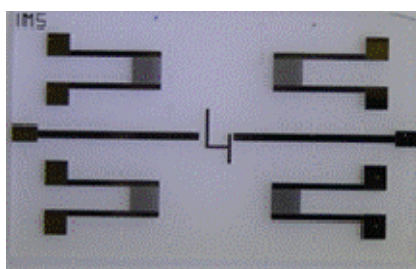


Figure IV. 1 Photographie du capteur acoustique à onde de love

IV.2.1.2. Nettoyage

Cette étape de frottement mécanique concerne les capteurs à la surface desquels se trouvent d'anciens dépôts, dans le cas contraire un lavage (acétone/isopropanol/eau déionisée) est suffisant.

IV.2.1.3. Activation Piranha

Les capteurs à onde de Love sont immergés dans une solution Piranha préparé par ajout délicat d'un volume de 20 ml de peroxyde d'hydrogène dans 20 ml d'Acide sulfurique. Cette solution est extrêmement corrosive et peut réagir violemment avec les composants organiques ; des gants, des lunettes et une visière sont requis pour la manipulation. Le mélange Piranha élimine les résidus organiques et métalliques et régénère par oxydation les groupes hydroxyles (groupe OH) préparant ainsi le substrat en vue de la fonctionnalisation. Les

substrats sont ensuite rincés abondamment avec de l'eau millipure (resistance $\geq 18 \times 10^6 \Omega$) et séchés à l'azote (Q. He *et al.*, 2011).

Après le bain Piranha qui dure 15 min, les capteurs sont par la suite rincés abondamment à l'eau déionisée et séchés à l'azote. Le protocole piranha est détaillé en annexe 1.

IV.2.1.4. Fonctionnalisation de la surface : silanisation

L'objectif de la silanisation est d'obtenir une polymérisation homogène par greffage covalent du polymère afin de contourner les inconvénients d'adhérence de la solution à la surface du substrat (Q. He *et al.*, 2011). Suite à une étude bibliographique des méthodes de traitement de surfaces en silicium menée par J. Courtois *et al.*, à partir de 90 protocoles de silanisation onze d'entre eux à base de la molécule γ -MAPS ((trimethoxysilyl) propyl methacrylate), se sont révélés les plus représentatifs comme moyens d'assurer l'ancrage *in situ* de polymères à la surface de substrats en SiO_2 (J. Courtois *et al.*, 2006). La technique de spectrométrie photoélectronique X (SPX) a été utilisée afin de caractériser l'état chimique de la surface en identifiant les réactifs liés. Des mesures d'angle de contact ont également été réalisées et corrélées aux résultats de la technique SPX. Un test d'adhérence a été réalisé par photopolymérisation d'une couche polymère de 1,6-butanediol diméthacrylate afin d'évaluer sa capacité à supporter les pressions hydrauliques appliquées. Ces travaux ont révélé que le meilleur protocole de silanisation était à base de toluène comme solvant, ceci correspond au protocole ST1 dans le Tableau IV. 1.

Tableau IV. 1 Liste des protocoles de silanisation étudiés par la technique SPX, les mesures d'angle de contact et les tests d'adhérence (J. Courtois *et al.*, 2006).

Silanization Procedure	Solvent	γ -MAPS (% v/v)	Water ^{d)}	Acetic acid ^{d)} (pH)	Temp. (°C)	Time (h)	DPPH ^{e)} (% w/v)	Water ^{f)} rinse	Drying ^{g)}	Storage ^{h)}
SM1	MeOH	50	No	-	RT	24	-	Yes	N ₂	
SM2	MeOH	50	No	-	RT	24	-	No	N ₂	
SE	EtOH	20	5%	5	RT	1	-	No	N ₂	24h at RT
ST1	Toluene	10	No	-	RT	2	-	No	N ₂	
ST2	Toluene	10	No	-	120	24	0.02	No	N ₂	
SW1	Water	0.4	Yes	3	RT	1	-	Yes	-	In water
SW2	Water	0.4	Yes	3	60	20	-	Yes	N ₂	
SD1	DMF	50	No	-	120	6	0.02	No	N ₂	
SD2	DMF	50	No	-	120	6	0.02	No	120 °C	Desiccator
SA1	Acetone	50	No	-	RT	24	-	No	80 °C	
SA2	Acetone	50	No	-	RT	0.5	-	Yes	N ₂	

Par ailleurs, le silane le plus utilisé dans les protocoles proposés dans ces travaux est le γ -MAPS dont la structure chimique est représentée en Figure IV. 2. La Figure IV. 3 quant à elle représente le principe de silanisation à la surface d'un substrat en SiO_2 .

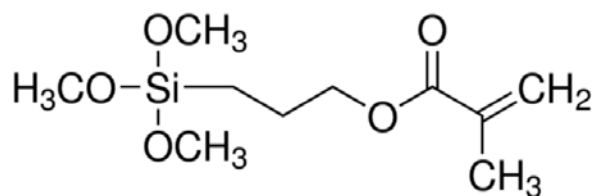


Figure IV. 2 Structure chimique de la molécule de silane γ -MAPS (3-[(methacryloyl)oxypropyl]trimethoxysilane) www.sigmaaldrich.com.

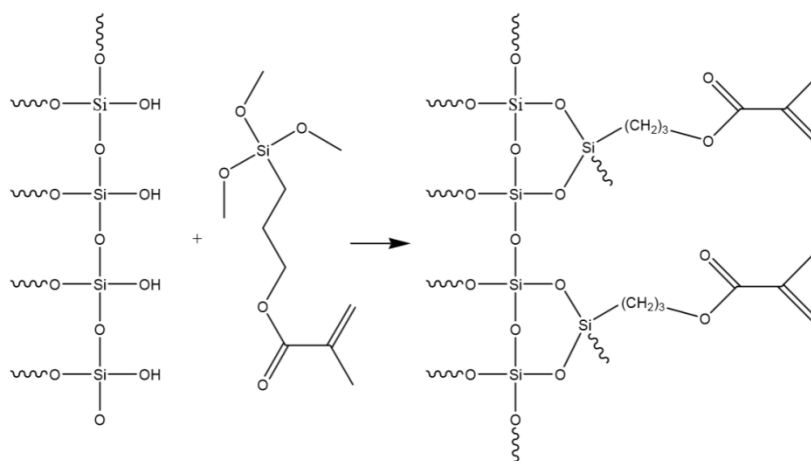


Figure IV. 3 Principe de la silanisation par γ -MAPS (J. Courtois, 2006).

Pour nos travaux, les capteurs sont rincés au Toluène et plongés dans une solution de silane (2%:1 (v/v) (trimethoxysilyl) propyl methacrylate /Toluène) pendant une nuit avant de les mettre dans une étuve à 200° C pendant 30 min. Les études de J. Courtois ont également souligné que la présence de l'eau dans la solution de silanisation augmentait la propension de l'agent de silanisation à réticuler. C'est pour cela que nous avons veillé à bien sécher nos substrats à l'azote avant le protocole de silanisation.

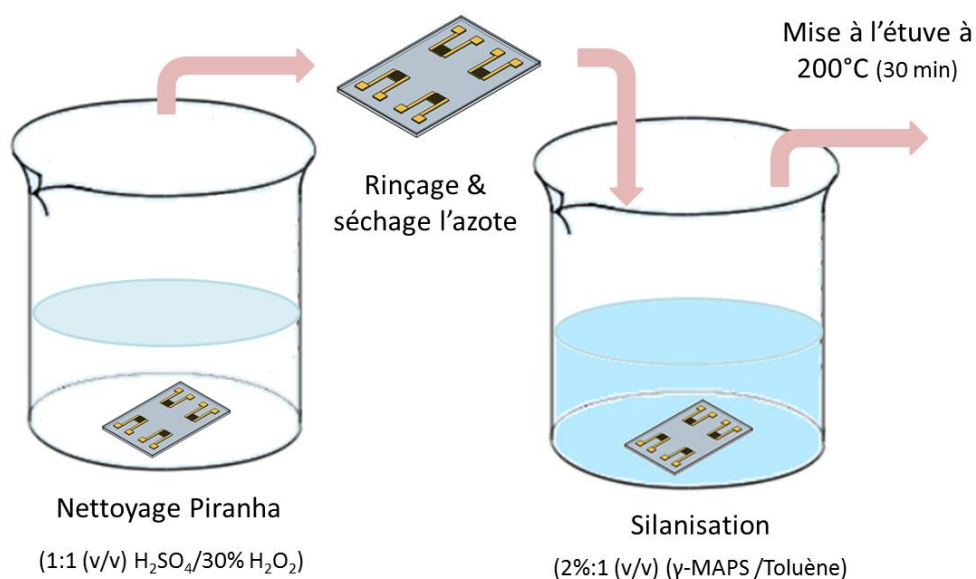


Figure IV. 4 Représentation des étapes de traitement de surface des substrats avant le dépôt des couches de MIP

La Figure IV. 5 représente des clichés MEB d'un capteur ayant subi une activation Piranha et une silanisation (2%:1 (v/v) silane/Toluène) pendant une nuit.

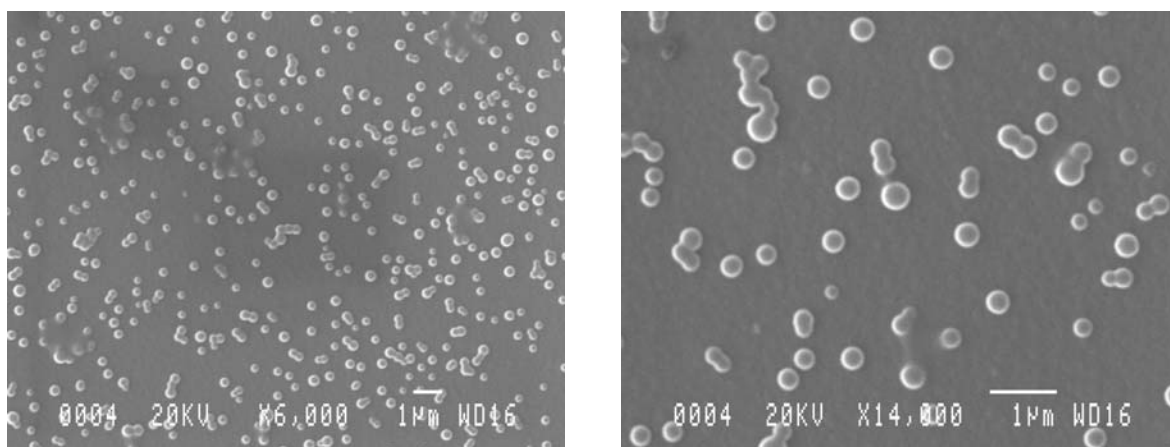


Figure IV. 5 Clichés MEB avec différentes magnifications d'un capteur ayant subi une activation Piranha et une silanisation pendant une nuit.

IV.2.1.5. Préparation de la solution prépolymérisée

- **La molécule cible AMP**

L'adénosine 5'-monophosphate (AMP) est un second messenger important des cellules qui a le rôle d'un médiateur des actions de plusieurs hormones, médicaments et neurotransmetteurs agissant via les surfaces des cellules des récepteurs (P. Turkewitsch *et al.*, 1998).

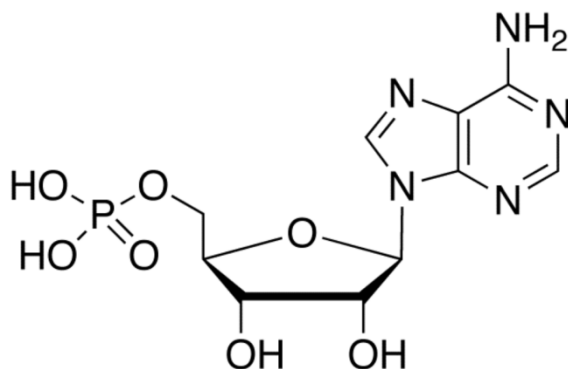


Figure IV. 6 Schéma et structure générale de l'adénosine monophosphate

Les analogues aux nucléosides dont fait partie ce nucléotide (AMP), jouent un rôle important dans les thérapies antivirales et anticancéreuses. Ces composants sont transformés par le kinase monophosphate du nucléoside en 5'-triphosphate actif pour exercer leur activité pharmacologique. En particulier, l'adenylate kinase (AK) faisant partie de la famille des kinases NMP qui catalyse le transfert d'un monophosphate depuis l'ATP à l'AMP sans formation d'intermédiaire covalent.

Les médicaments antiviraux comme le 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-adenine (PMEA, adefovir) et (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-adenine ((R) PMPA, tenofovir), approuvés respectivement dans les thérapies contre le SIDA et l'hépatite B, s'appuient sur l'AMP kinase pour leur activation, engendrant ainsi des métabolites persistants.

Les six formes connues des isoformes des AMPKs sont hautement conservées et possèdent un site de reconnaissance similaire pour l'AMP. AMPK1 est l'une des protéines cytosolique les plus abondantes dans les muscles des vertébrés avec une concentration de 0.1 nM. L'AMPK2 situé dans l'espace intermembranaire mitochondrial, joue un rôle important dans le métabolisme d'énergie du cœur, du foie, et des reins. L'AMP est étroitement lié au site récepteur à travers des liaisons polaires avec différents groupements du substrat. La base adénine N-6 et N-1 interagit avec les résidus threonine-39 et le glutamine-101 de l'enzyme. Le groupe 2'OH est lié par le glutamine-65 et le groupe phosphate est stabilisé dans la cavité par deux groupements arginine (Arg-44 et Arg-97).

F. Breton *et al.*, avaient développé un polymère à empreinte moléculaire en forme volumique (*bulk*) qui devait interagir avec les trois fonctions citées de l'AMP (F.Breton *et al.*, 2009). Différents monomères fonctionnels interagissant avec le groupement phosphate ont été testés. Le MIP présentant les meilleures propriétés de recapture envers l'AMP était composé d'un

équivalent de DMAEM et dix équivalents d'acrylamide comparé à l'AMP. Des essais de recapture de ce MIP envers l'AMP ont été réalisés en cartouches en phase solide, le polymère a ainsi démontré des caractéristiques similaires à celle de l'enzyme vu qu'il était spécifique à l'AMP en présence d'autres nucléotides. Ces travaux se sont focalisés sur le choix du monomère fonctionnel afin d'interagir avec le groupement phosphate de l'AMP. Cette fonction reconnue par le kinase est responsable de la polarité élevée de l'AMP et de son hydrophilie. Elle peut former des interactions ioniques fortes avec les monomères.

P. Turkewitsch *et al.* ont proposé dans leur travaux, un MIP pour détecter l'AMP qui contient un élément fluorescent (trans-4-[p-(N,N-diméthylamino)styril]-N-vinylbenzylpyridinium chloride) comme une partie des cavités de reconnaissance jouant à la fois le rôle de l'élément de reconnaissance et de l'élément de mesure pour la détection par fluorescence de l'AMP en milieu liquide. Ce MIP a démontré une atténuation de la fluorescence en présence de l'AMP en milieu liquide, tandis qu'aucun effet n'a été observé en présence de la molécule GMP dont la structure est semblable à l'AMP (P. Turkewitsch *et al.*, 1998).

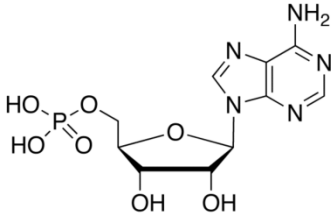
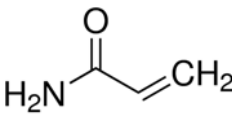
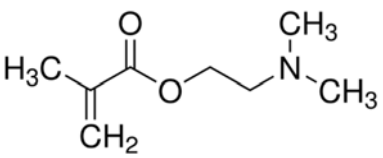
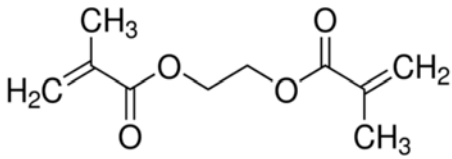
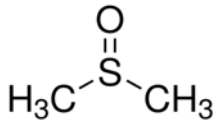
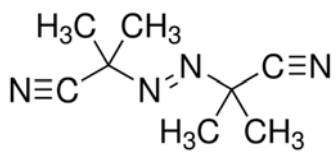
La synthèse de MIPs sélectif d'un composé (*template*) nécessite de trouver le « cocktail » optimal de monomères, réticulant, solvant de polymérisation ; ce choix est guidé par la polarité de la molécule, celle du milieu d'extraction (eau, urine) et de l'hydrophobie du polymère. Ainsi, le choix du réticulant, de l'initiateur et des conditions de polymérisation (solvant, température, intensité de la source d'initiation et durée de la polymérisation) ont une influence directe sur le matériau formé et *in fine* sur l'hétérogénéité de sites de liaison créés dans le polymère (*binding sites*). Le choix de notre partenaire ICOAs'est porté vers le nucléotide commercial AMP (analogue au nucléoside) afin de synthétiser un MIP à base d'une approche non covalente.

- **Protocole de préparation de la solution MIP/AMP**

Suite à une semaine de formation à l'institut de chimie organique et analytique (ICOA) d'Orléans, nous avons rédigé le protocole de préparation de la solution MIP AMP adapté aux dépôts en couches minces (< 500 nm) sur nos capteurs à onde acoustique. La solution prépolymérisée est obtenue en additionnant les différents réactifs (monomère (Acrylamide), monomère chargé (DMAEM), réticulant (EGDMA), empreinte (*template*) (AMP), initiateur (AIBN), solvant (DMSO)) selon différentes proportions. Le Tableau IV. 2 montre les différents réactifs utilisés ainsi que leur volume ou masse pour préparer une solution stock de 3,7 ml de MIP. Il convient de remarquer que nous avons opéré des changements de viscosité

par rapport au protocole volumique de préparation de MIP relaté dans les travaux de F. Breton (F. Breton *et al.*, 2009).

Tableau IV. 2 Les différents réactifs utilisés pour la préparation d'une solution stock de MIP et leurs structures chimiques

Nom du réactif	Structure chimique <i>www.sigmaaldrich.com</i>	Quantité
Template adenosine 5'-monophosphate (AMP)		50 mg
Monomère 2-propénamide (Acrylamide)		102.3 mg
Monomère chargé 2- diméthyl(aminoéthyl) méthacrylate (DMAEM)		24.2 µl
Réticulant Ethylene glycol diméthacrylate (EGDMA)		1.49 ml
Solvant Diméthyl sulfoxyde (Dry DMSO)		1.1 ml
Initiateur 2,2'-Azobis(2-méthylpropionitrile) (AIBN)		16 mg

Dans ce MIP, le DMAEM est utilisé pour interagir avec le groupement phosphate anionique de l'AMP. C'est un monomère chargé pouvant créer des interactions ioniques avec l'empreinte (*template*) AMP selon le pH du milieu. L'acrylamide a été retenu comme le meilleur monomère fonctionnel pour complexer la base nucléique et le ribose de l'AMP grâce à des liaisons hydrogène. Le DMSO a été choisi comme solvant porogène car il était le seul solvant capable de solubiliser l'AMP. La réactivité du réticulant devant être similaire à celle du monomère fonctionnel, les ratios molaires du réticulant et du monomère fonctionnel sont également importants. Les liaisons hydrogène dépendent généralement de la distance et la

direction entre les monomères et les empreintes. L'EGDMA est le réticulant le plus court pouvant assurer une grande sélectivité.

Afin de préparer cette solution, il faut s'équiper des instruments spécifiés en annexe 2, respecter l'ordre suivant et veiller à ce que le mélange de tous les réactifs soit préparé sous la hotte :

Dans un flacon en verre nettoyé à l'acétone et séché à l'azote est versée l'empreinte sous forme de poudre. Sont ajoutés l'acrylamide et le DMAEM (Ouvrir le flacon de DMAEM, prendre la quantité avec la micropipette et refermer très rapidement, injecter le contenu de la micro pipette en s'assurant que la pipette touche l'intérieur du flacon). Puis le réticulant EGDMA est ajouté à son tour et la solution agitée au vortex pendant 5min. Est ensuite injecté le Dry DMSO pris avec une seringue à travers le couvercle en caoutchouc en s'assurant que la seringue n'est pas contaminée. Le Dry DMSO est préféré au DMSO qui a tendance à absorber l'eau et cela peut être un problème lors de la polymérisation. Le flacon contenant le MIP est placé dans un bain ultrasons avec de l'eau pendant 1 heure, pour bien mélanger les constituants. La solution est purgée à l'azote avec une seringue et une aiguille reliées au bout de la ligne d'azote afin d'éliminer l'oxygène (Plonger la seringue profondément dans la solution). On prélève 500 μ l de cette solution à laquelle est ajouté 1% en volume d'AIBN juste avant la polymérisation. Le flacon refermé, le mélange est mixé dans un bain ultrason et du parafilm permet d'étanchéifier le couvercle.

La solution stock obtenue (AMP/Acrylamide/DMAEM/EGDMA/DMSO) sans AIBN est photo et thermosensible, elle doit être stockée au réfrigérateur dans un flacon teinté. Une fois l'AIBN ajouté il faut l'utiliser immédiatement. L'AMP après utilisation doit être conservé au congélateur; l'AIBN quant à lui doit être stocké au réfrigérateur dans une bouteille teintée.

IV.2.1.6. Dépôt par centrifugation (Spin-coating)

- ***Principe du dépôt à la tournette***

La méthode de *spin-coating* peut être décomposée en quatre étapes représentées dans la Figure IV. 7. Les étapes de dépôt, de mise en rotation ainsi que l'élimination de l'excès de solution se succèdent tandis que l'évaporation a lieu tout au long du protocole constituant ainsi l'une des raisons de l'amincissement des couches déposées.

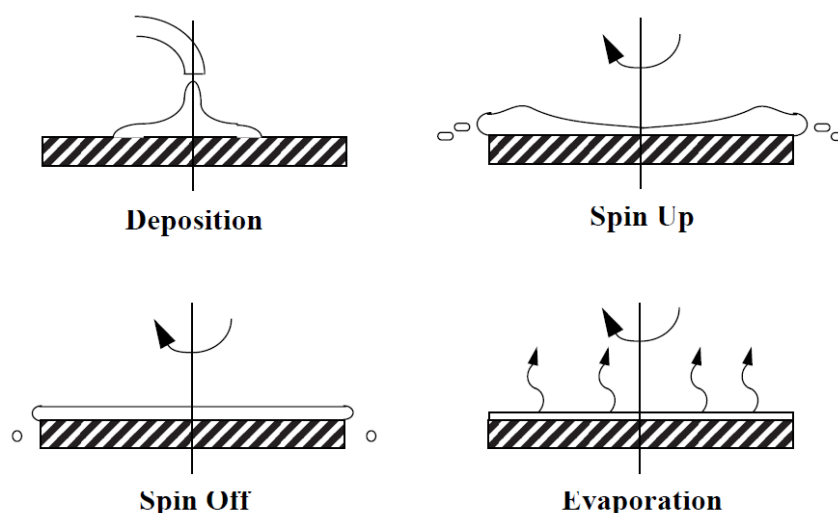


Figure IV. 7 Les quatre principales étapes du protocole de spin-coating (G.A. Luurtsema, 1997).

La première étape consiste à déposer une quantité excessive de la solution à la surface d'un substrat stationnaire ou en rotation à très faible vitesse. La solution est déposée au centre du substrat. Une quantité excessive est utilisée afin d'éviter les discontinuités de dépôt dues à l'assèchement de la solution avant que celle-ci n'ait atteint les bords du substrat. Dans l'étape de mise en rotation, le substrat est accéléré jusqu'à une vitesse palier. Comme les forces rotationnelles entraînent la solution, des fronts d'onde se forment et circulent jusqu'au bord du wafer par la force centrifuge, laissant ainsi une couche assez uniforme. Pendant la troisième étape, l'excès de solvant est évacué du fait que le substrat subit une rotation entre 2000 et 8000 rpm. Le dépôt s'amincit en premier lieu grâce aux forces centrifuges jusqu'à ce qu'il y ait assez de solvant évaporé pour augmenter la viscosité à un tel niveau que l'étalement cesse. Cette étape a lieu approximativement 10 s après la mise en rotation.

L'évaporation du solvant apparaît ainsi comme la première méthode d'amincissement du film une fois que la rotation du substrat a cessé. L'évaporation est un procédé complexe par lequel une partie du solvant en excès est absorbée dans l'atmosphère. Si une évaporation prématurée a lieu, une pellicule solide se forme à la surface du fluide qui empêche l'évaporation du solvant piégé (sous la pellicule) et qui lorsqu'elle est sujette aux forces centrifuges de la rotation du substrat, cause des défauts d'étalement. Des couches de différentes épaisseurs peuvent être réalisées par *spin-coating* car l'épaisseur est inversement proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de rotation. Plus la vitesse de rotation est importante, plus il est difficile de trouver un solvant qui ne s'assèche pas avant d'atteindre les bords du substrat (G.A. Luurtsema, 1997). Meyerhofer a développé un modèle précis pour l'épaisseur de la

couche (h) qui inclut l'évaporation comme paramètre en fonction de la vitesse de rotation (D. Meyerhofer, 1987). Celui-ci est décrit par l'équation VI.1.

$$h_f = \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right) \left\{ \frac{3\mu_0 e}{[2\rho\omega^2(\rho_0/\rho)]} \right\}^{1/3} \quad (\text{VI.1})$$

Les variables de l'équation IV.1 sont :

- h_f : l'épaisseur du film ;
- ρ : la densité de la solution déposée ;
- ω : la vitesse angulaire ;
- μ : la viscosité de la solution ;
- e : le taux d'évaporation.

Comme sa maturité le reflète, le dépôt par centrifugation (*spin-coating*) présente plusieurs avantages dont l'absence de variables croisées. En effet, la vitesse et la viscosité sont les uniques degrés de liberté faisant ainsi du *spin-coating* une méthode robuste. Il est donc aisé de changer l'épaisseur du film en variant la vitesse de rotation ou en choisissant une solution d'une viscosité différente. Un autre avantage du *spin-coating* réside dans la capacité du film à s'uniformiser progressivement et à maintenir cette uniformité tout au long du procédé. De plus, plusieurs études ont été réalisées et de nombreuses informations sont disponibles le concernant. Cependant, outre la nécessité de promouvoir l'adhérence du film à la surface du substrat, cette méthode présente des inconvénients et perd en efficacité pour des substrats de taille importante. Par ailleurs, cette méthode n'utilise que 2 à 5 % de la solution déposée à la surface du substrat tandis que le reste est évacué et éliminé. Non seulement les prix des solutions utilisées pour les dépôts à la tournette peuvent être importants mais également ceux des méthodes de traitement des déchets.

• ***Dépôts par centrifugation (spin-coating) sur substrats rectangulaires***

Trois problèmes apparaissent dans le procédé de dépôt par centrifugation (*spin-coating*) sur substrat rectangulaire, à savoir : les effets de bord, les effets géométriques et les effets Bernoulli.

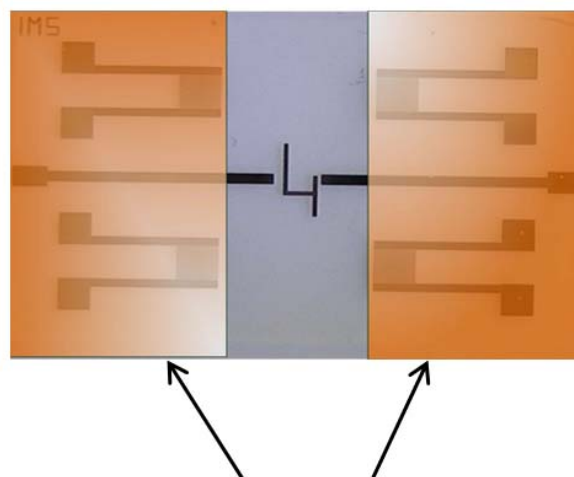
Les effets de bord sont dus aux propriétés de la solution s'étalant sur le substrat et ont lieu indépendamment de sa géométrie. Ces propriétés comprenant la viscosité et la tension de surface dictent un angle de contact constant à l'interface solide-liquide-gaz. Cet effet se manifeste par une concentration du solvant sur les bords du substrat entraînant une augmentation de l'épaisseur du dépôt sur les bords.

Un autre problème dans le procédé de dépôt par *spin-coating* sur substrats rectangulaires est l'effet géométrique du substrat sur la structuration de la solution dans les coins. Celui-ci est dû à la friction croissante avec l'air en périphérie du substrat qui engendre une évaporation rapide causant la formation d'une pellicule sèche dans les coins qui entrave l'étalement de la solution. La solution au centre du substrat, qui est toujours entraînée par la rotation, s'étale au-dessus de la pellicule sèche engendrant une accumulation dans les coins.

Le troisième problème qui peut apparaître est l'effet Bernoulli. Celui-ci est dû à un effet aérodynamique engendré par l'extrémité du substrat et l'angle de contact de l'effet de bord, en effet le flux d'air se sépare car le substrat est en rotation. Afin d'éviter cet effet, il est possible de protéger l'extrémité du substrat de l'air en logeant celui-ci dans un mandrin "*chuck*" de forme extérieure circulaire pendant le procédé.

Pour nos travaux, nous avons choisi le procédé de dépôt à la tournette (*spin-coating*) sur le capteur entier avec un masquage par Kapton comme le montre la Figure IV. 8 afin de localiser le film MIP sur la zone active des capteurs. Le Kapton® est un film polyimide adhésif de 50 µm d'épaisseur que nous avons déposé de part et d'autre du capteur laissant libre une bande de la largeur de la zone active avant dépôt du polymère. L'utilisation de ce ruban, présente l'avantage de ne pas altérer le substrat lorsqu'il est retiré. Il est également simple à utiliser et possède une bonne stabilité mécanique et chimique. Pour limiter au maximum les effets de bord, le Kapton est retiré rapidement juste après le dépôt.

La méthode de dépôt à la tournette permet une meilleure homogénéité de l'épaisseur de la couche sensible par rapport à la technique d'impression par jet d'encre (L. Elisabeth *et al.*, 2008) et constitue une méthode courante pour produire un film mince (100nm-1µm) de polymère uniforme sur un substrat. Pour améliorer l'adhérence de la solution sur le substrat, il est nécessaire d'utiliser des « promoteurs d'adhérence », en modifiant chimiquement la surface, nous avons ainsi choisi la silanisation.



Représentation du masque de Kapton

Figure IV. 8 Localisation de la couche mince de polymère à empreinte moléculaire sur la zone centrale de la double ligne à retard et dessin du masque de Kapton®.

La tournette utilisée au laboratoire IMS est un appareil de marque SÜSS Microtech, de modèle CT62 présenté en Figure IV. 9.

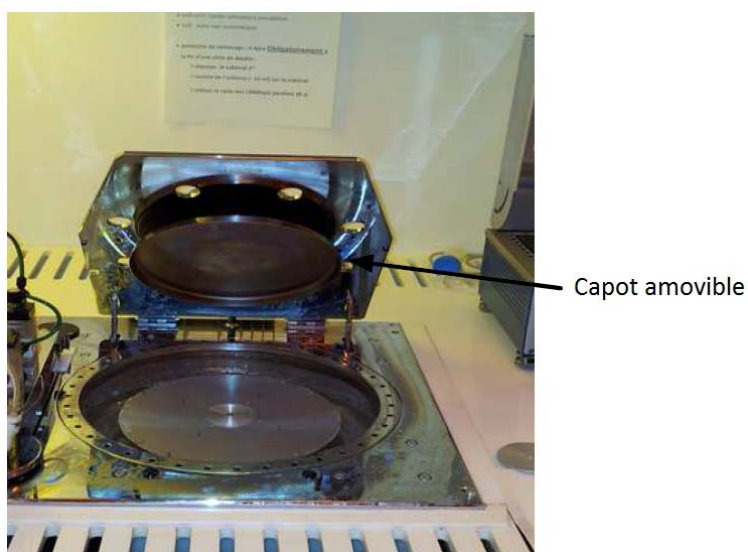


Figure IV. 9 Photographie de la tournette (spin-coater)

Le capot amovible dont il est muni, permet d'isoler de manière semi-étanche la couche liquide de l'atmosphère ambiante. La fermeture immédiate du capot après le dépôt de la solution sur le substrat, permet de confiner le solvant en ralentissant son évaporation.

Les paramètres importants influant sur l'épaisseur et la qualité du dépôt sont les suivants :

- Le temps de rotation qui est paramétrable : nous avons utilisé des valeurs comprises entre 10 et 60 secondes pour tous les dépôts réalisés.

- L'accélération programmable, avec laquelle est atteinte la vitesse. C'est un paramètre influant sur la qualité du dépôt, nous avons choisi de tester des valeurs comprises entre 300 et 4000 rpm/s.
- La vitesse de rotation : la tournette utilisée, permet d'atteindre des vitesses de rotation de 7000 rpm. Lors de nos essais, nous avons réalisé les dépôts à des vitesses de rotation comprises entre 400 et 2000 rpm.
- Le volume de solution : ce paramètre influe sur la quantité de matière introduite et sur l'épaisseur du dépôt réalisé. Lors de notre étude, nous avons préalablement recouvert l'ensemble du substrat de la solution à déposer avant la mise en rotation. Les volumes utilisés sont compris entre 5 et 20 μL pour les dépôts sur lames de verre.

Une bonne maîtrise de ces paramètres conduit à l'obtention d'un dépôt d'épaisseur très homogène. Tous les dépôts sont réalisés systématiquement à capot fermé du début jusqu'à la fin de la procédure de dépôt par *spin-coating*. Un programme de dépôt a été mis au point de manière à obtenir des couches minces homogènes. Par ailleurs, afin d'immobiliser le capteur et de limiter l'effet Bernoulli pendant la rotation, celui-ci a été placé dans un mandrin "chuck" comme le montre la Figure IV. 10.

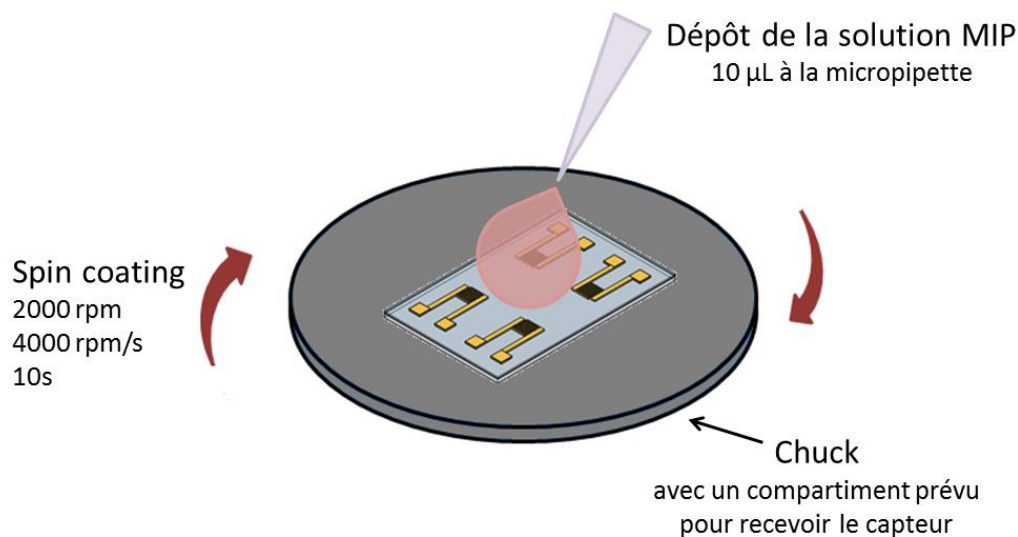


Figure IV. 10 Représentation de l'étape de dépôt de MIP à la tournette

- **Tests préliminaires de dépôt**

Pour l'application capteurs, des études préliminaires ont été réalisées. Elles permettent d'appréhender les problèmes liés aux dépôts de MIPs sur des dispositifs de détection et en particulier, de définir les paramètres permettant d'obtenir des couches minces homogènes

d'épaisseurs contrôlées. Les supports de test sont des capteurs acoustiques à onde de Love. Le Tableau IV. 3 résume les conditions testées et les résultats obtenus.

D'une manière générale, pour les capteurs n'ayant subi aucune fonctionnalisation de surface, les dépôts réalisés ne sont pas homogènes. Quel que soit le volume utilisé, le temps de rotation, la vitesse ou l'accélération, le dépôt obtenu a tendance à être localisée sur une partie du support ce qui révèle une difficulté de la solution à mouiller le substrat. Afin d'améliorer l'étalement des solutions polymères, la surface SiO₂ a été soumise à une préparation de surface : un nettoyage utilisant un mélange Piranha et une silanisation. Un meilleur mouillage pour le substrat est obtenu après ces traitements. Par comparaison avec les premiers essais de *spin-coating*, le traitement de surface a donc amélioré la qualité du dépôt.

Tableau IV. 3 Essais de spin-coating réalisés avec une solution de MIP AMP sur des capteurs

<i>Vitesse (rpm)</i>	<i>Quantité</i>	<i>% Silane</i>	<i>Solvant</i>	<i>Polymérisation</i>	<i>Couvercle de la tournette</i>	<i>Kapton</i>	<i>Epaisseur moyenne</i>
<i>Accélération (rpm/s)</i>	<i>Solution</i>	<i>Temps de silanisation</i>					<i>homogénéité après polymérisation</i>
<i>Temps (s)</i>							
400	5µl	aucun	DMSO	3h	ouvert	sans	Etalement
300/4000		traitement de surface	2mL				inhomogène
10/30							
400	5µl	1%	DMSO	45 min	ouvert	sans	Etalement
4000		1 nuit	2mL				inhomogène
40							
400	5µl	1%	DMSO	3h	ouvert	sans	dépôt homogène
300/4000		1 nuit	2mL				
10/30							
400	5µl	1%	DMSO	3h	ouvert	sans	dépôt homogène
4000		1 nuit	2mL				
40							
700	5µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	300nm
4000		1 nuit	2mL				dépôt homogène
40							

<i>Vitesse (rpm)</i>	<i>Quantité</i>	<i>% Silane</i>	<i>Solvant</i>	<i>Polymérisation</i>	<i>Couvercle de la tournée</i>	<i>Kapton</i>	<i>Epaisseur moyenne</i>
<i>Accélération (rpm/s)</i>	<i>Solution</i>	<i>Temps de silanisation</i>					<i>homogénéité après polymérisation</i>
<i>Temps (s)</i>							
700	5µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	200nm
4000		1 nuit	2mL				dépôt homogène
40							
500	30µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	300 nm
4000		1 nuit	2mL				homogene
40							
400	30µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	40 -> 600 nm
400		1 nuit	2mL				non homogène
40							
400	30µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	500nm
4000		1 nuit	2mL				homogène
40							
400	5µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	50 -> 800 nm
4000		1 nuit	2mL				
40							
400	10 µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	300 nm
4000		1 nuit	2mL				homogène
40							
1000	20 µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	400nm
4000		1 nuit	2mL				homogène
20							
1000	10µl	1%	DMSO	3h	ouvert	avec	65 -> 300 nm
4000		1 nuit	2mL				
20							
1000	5 µl	2%	DMSO	3h	ouvert	avec	30 -> 560 nm

<i>Vitesse (rpm)</i>	<i>Quantité</i>	<i>% Silane</i>	<i>Solvant</i>	<i>Polymérisation</i>	<i>Couvercle de la tournée</i>	<i>Kapton</i>	<i>Epaisseur moyenne</i>
<i>Accélération (rpm/s)</i>	<i>Solution</i>	<i>Temps de silanisation</i>					<i>homogénéité après polymérisation</i>
<i>Temps (s)</i>							
4000	100 mg	1 nuit	2mL				
30	5 min ds l'azote						
1500	10 µl	2%	DMSO	3h	ouvert	avec	50 nm -> 1µ
4000	5 min ds l'azote	1 nuit	2mL				
20							
2000	10 µl	2%	DMSO	1h	fermé	avec	200 à 500 nm
4000	5 min ds l'azote	1 nuit	2mL				
10							
2000	10 µl	2%	DMSO	1h	fermé	avec	200 à 500 nm
4000	5 min ds l'azote	1 nuit	1mL				
10							

Le traitement Piranha/ Silane utilisé en salle blanche permet ainsi d'obtenir des dépôts homogènes après *spin-coating* sur des capteurs avec une solution polymère à base de DMSO.

Par ailleurs, le *spin-coating* permet, selon la fluidité de la solution, d'obtenir des couches d'épaisseurs variables pouvant aller d'une centaine de nanomètres au micron. Nous avons procédé à un changement de viscosité de la solution MIP déposée en modifiant la quantité de solvant DMSO. Les tests réalisés avec différents volumes de solvant (en fixant tous les autres paramètres) ont révélé que la quantité optimale pour obtenir des dépôts homogènes à la surface des capteurs est de 1.1 ml au lieu de 2.2 ml pour une quantité de 50 mg d'AMP.

Ainsi, cette étude a permis d'appréhender les principaux paramètres de *spin-coating* à maîtriser pour obtenir des dépôts adaptés au test des applications capteurs :

- la vitesse et l'accélération,
- la viscosité des solutions polymères.

Dans cette étude, les conditions retenues sont une vitesse de 2000t/min, une accélération de 4000t/min² avec 50% de solvant en moins par rapport au protocole volumique de préparation des MIPs.

IV.2.1.7. Polymérisation

L'amorçage de la polymérisation se fait par rayonnement aux UV à 365 nm. On utilise généralement des azo-amorceurs (AIBN) du fait de leur capacité à amorcer un grand nombre de monomères que ce soit par voie chimique ou photochimique. Cependant la présence d'oxygène dans le milieu inhibe la polymérisation car ces amorceurs sont capables de former des radicaux stables avec l'oxygène. D'où la nécessité de polymériser en milieu inerte où circule de l'azote afin qu'il soit en excès par rapport à l'oxygène. Dans notre cas, la chambre représentée en Figure IV. 11, n'est pas complètement étanche et l'azote circule ainsi pendant toute la durée de la polymérisation.

Des essais de photo-réticulation de différentes durées ont été effectués sur les échantillons réalisés par *spin-coating*. Comme le montre le Tableau IV. 3, les capteurs recouverts de MIP irradiés par des rayons UV à 365 nm pendant 1h ont permis l'obtention de films réticulés liés au capteur de manière covalente.

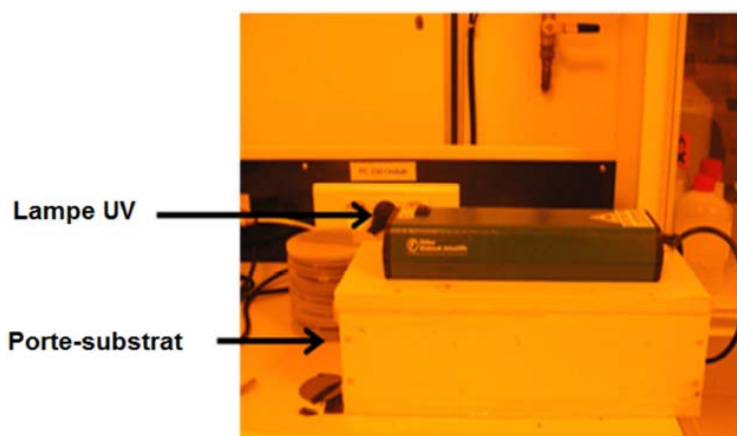


Figure IV. 11 Enceinte de polymérisation sous atmosphère inerte

La Figure IV. 12 illustre les interactions des différents réactifs du MIP/AMP pour former le film à la surface du capteur après la polymérisation.

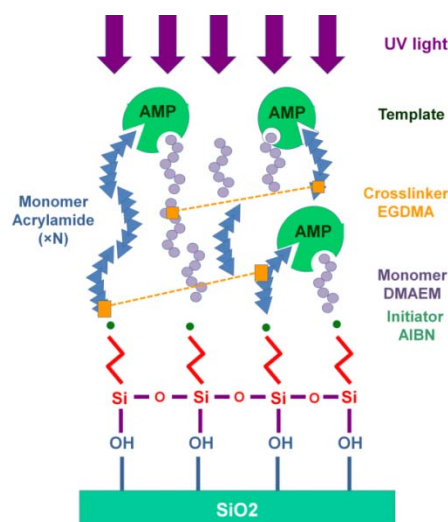


Figure IV. 12 Interactions des différents réactifs du MIP pour former le film à la surface du capteur

Le Tableau IV. 4 résume les paramètres retenus suite aux essais de dépôts par *spin-coating* réalisés avec une solution de MIP AMP sur des capteurs. Il est à noter que l'expérience de photo-réticulation a montré la faisabilité de films réticulés.

Tableau IV. 4 Paramètres retenus suite aux essais de dépôts par centrifugation (*spin-coating*) réalisés avec une solution de MIP AMP sur des capteurs

Substrat	Vitesse Accélération Temps	Quantité Solution	Polymérisation	Epaisseur moyenne homogénéité
Capteur	4000 rpm	10 μ l	Polymérisation UV à 365nm pendant 1h sous atmosphère inerte	~500 nm
	4000 rpm			Dépôt
	10s			homogène

La Figure IV. 13 résume les étapes, détaillées précédemment, de traitement de surface, de dépôt et de polymérisation à la surface de SiO₂ du capteur.

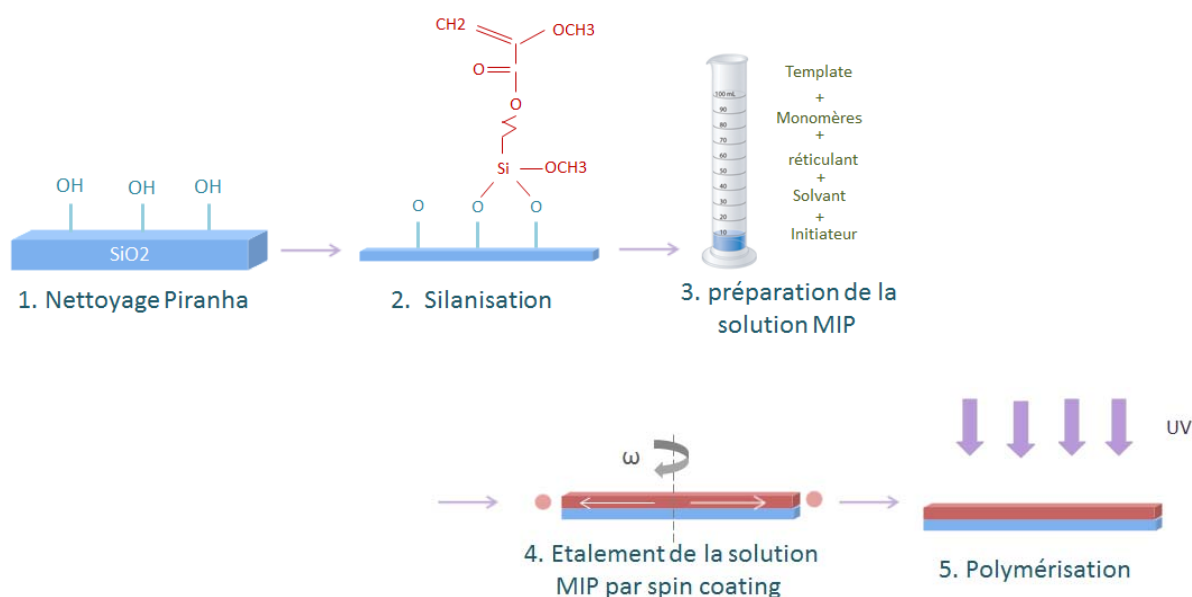


Figure IV. 13 Etapes du protocole de dépôt de la solution MIP/AMP

IV.2.2. Caractérisation des couches minces du MIP-AMP

La caractérisation du MIP consiste dans un premier temps à vérifier la compatibilité des couches minces de MIP avec la propagation de l'onde sur le chemin acoustique du capteur. Ces résultats sont complétés par une étude de la morphologie du matériau (taille, forme des particules, porosité et surface spécifique) grâce la microscopie électronique. Les épaisseurs des couches minces sont évaluées par profilométrie optique et mécanique. Des résultats classiquement obtenus après la mise au point des protocoles décrits plus haut sont présentés en suivant.

IV.2.2.1. Profilométrie mécanique et optique

Comme indiqué plus haut, une première série de tests a permis de mettre au point un protocole afin d'obtenir des dépôts de MIP à base d'AMP d'épaisseurs contrôlées, homogènes et qui adhèrent à la surface. Les photographies suivantes représentent des dépôts de différentes épaisseurs, de 50 à 500 nm, mesurées par profilométrie mécanique (Veeco-Dektak 150) au niveau de la bordure du film (« marche ») visible sur ces images. Celles-ci sont obtenues à l'aide de la caméra du profilomètre à stylet.

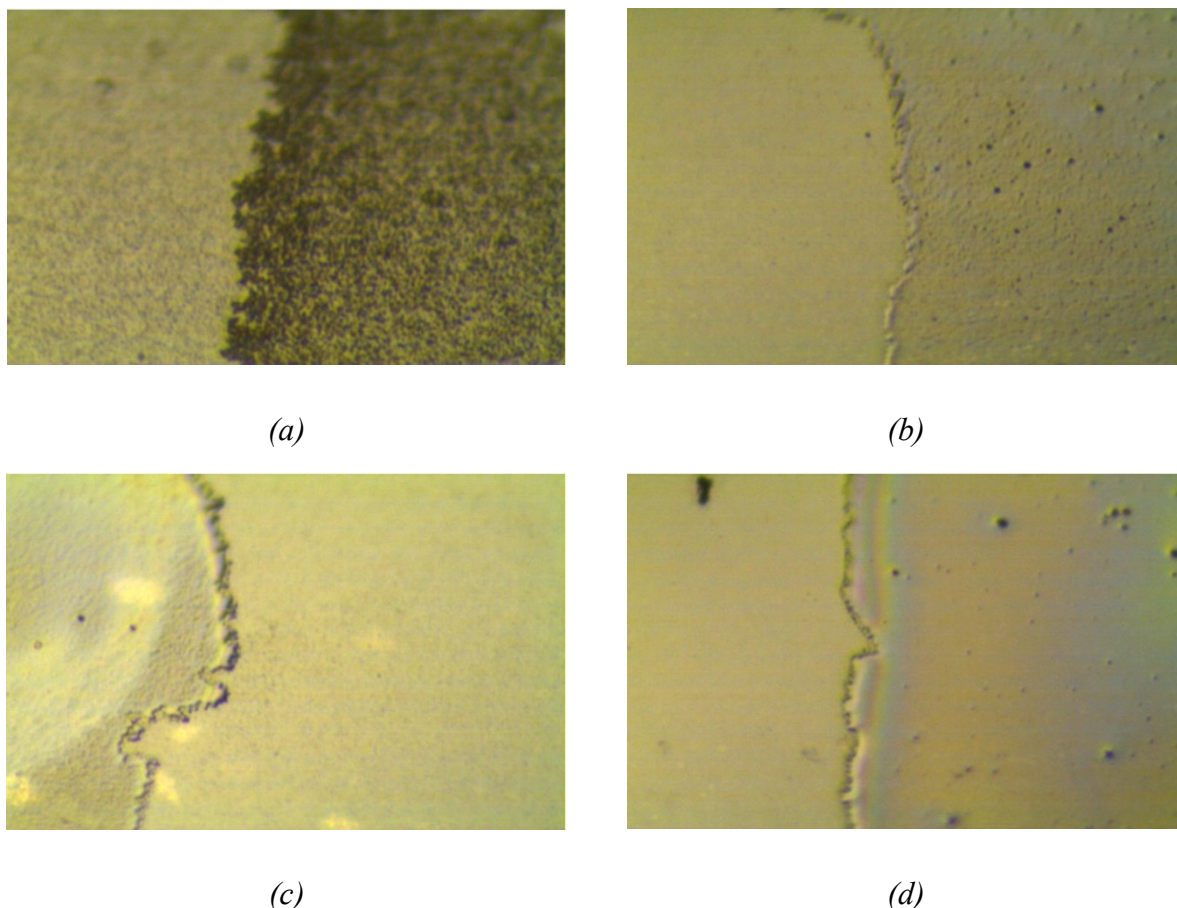


Figure IV. 14 Photographies par profilomètre à stylet de films minces de MIP/AMP, de différentes épaisseurs, déposés à la surface sur des capteurs acoustiques (zoom : 600x): (a) 50 nm, (b) 100 nm , (c) 200 nm , (d) 500 nm.

Un profilomètre optique Veeco a été utilisé pour étudier l'état de surface des dépôts et mesurer leurs épaisseurs. L'utilisation du profilomètre optique (Veeco) permet de visualiser les structures en 3D. L'image obtenue représente une zone de $1,3 \times 0,9 \text{ mm}^2$, au niveau de la bordure des films minces. En outre, cette technique permet, d'estimer l'épaisseur des dépôts grâce au profil X et l'état de surface (rugosité) grâce au profil Y. L'analyse des coupes met ainsi en évidence l'homogénéité du film mince.

Pour comparaison, des dépôts de MIP/ AMP à base de DMSO ont été réalisés sans nettoyage Piranha ni silanisation. Les paramètres utilisés lors de ces dépôts sont ceux du Tableau IV. 4. Ces dépôts ont été caractérisés par profilométrie optique. L'image 3D de la Figure IV. 15, représentant une zone de $1,3 \times 0,9 \text{ mm}^2$, au niveau de la bordure d'un de ces films polymère, révèle un dépôt hétérogène. En effet, le polymère ne recouvre pas totalement la zone de dépôt du substrat, mais forme plutôt de petits amas à sa surface, ce qui indique une difficulté de la solution à mouiller le substrat. Aussi, pour limiter ce problème et garantir une forte adhésion du polymère, il est important de réaliser un traitement chimique du substrat.

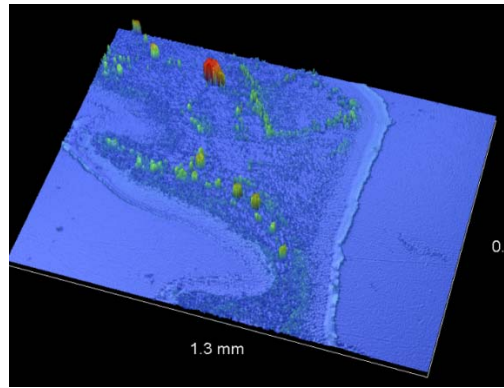


Figure IV. 15 Image 3 D par profilométrie optique d'un dépôt à la surface d'un capteur sans nettoyage piranha ni silanisation.

Les images suivantes représentent chacune une zone de $1,3 \times 0,9 \text{ mm}^2$, au niveau de la bordure de films de MIP/AMP à base de DMSO. Pour ces mesures nous avons fixé les paramètres : viscosité de la solution, quantité de solution, accélération/temps de rotation et temps de polymérisation, et varié la vitesse de rotation de la tournette d'une valeur de 1500 rpm à 2500 rpm.

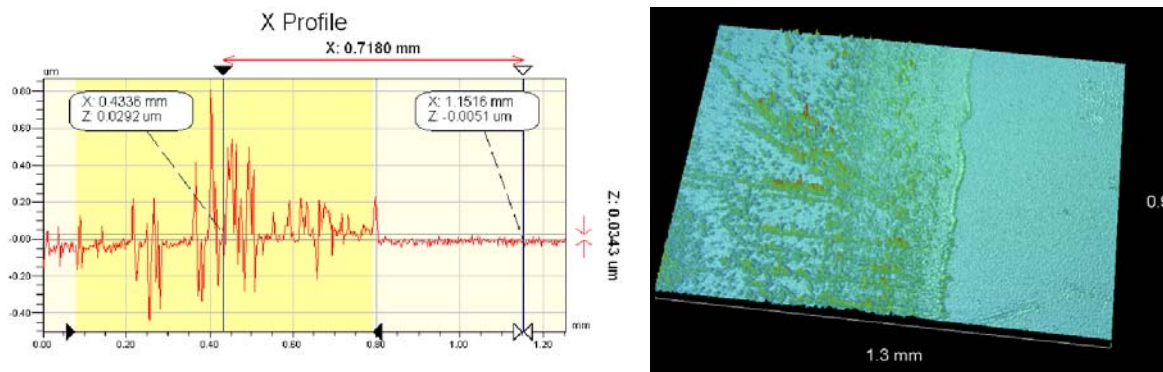


Figure IV. 16 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (34 nm, vitesse 2500 rpm), b) image 3 D de surface.

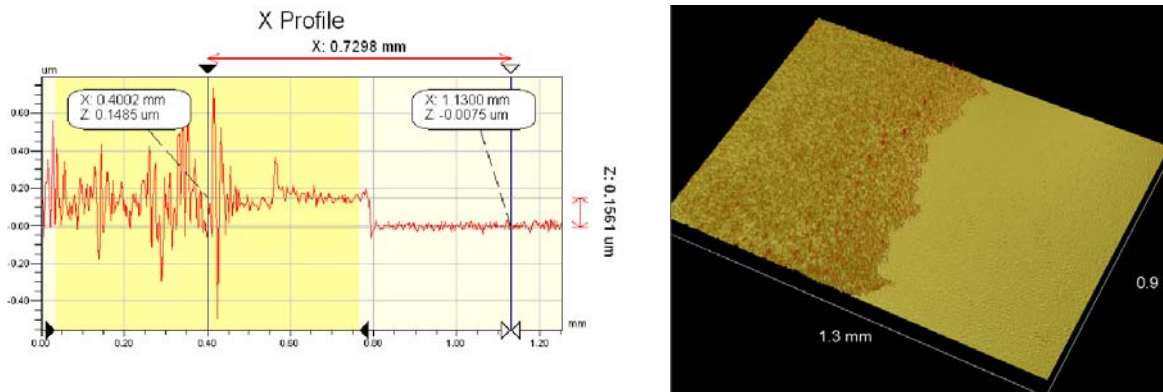


Figure IV. 17 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (130 nm, vitesse 2300 rpm), b) image 3 D de surface.

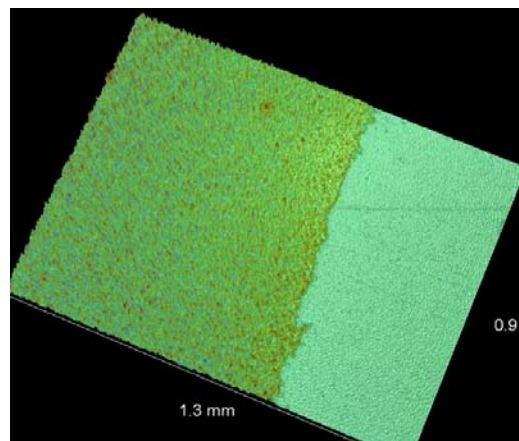
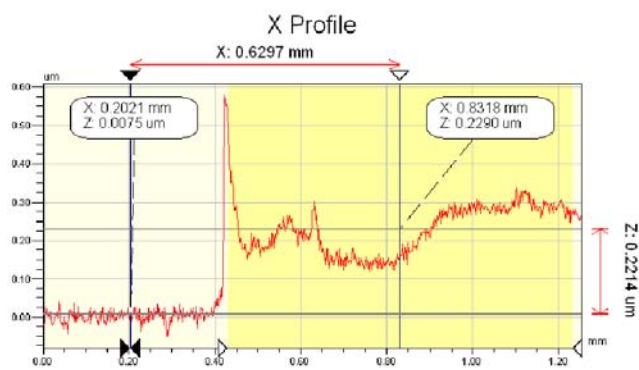


Figure IV. 18 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (230, vitesse 2200 rpm nm), b) image 3 D de surface.

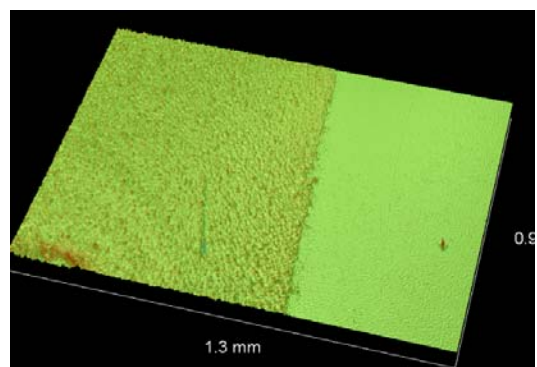
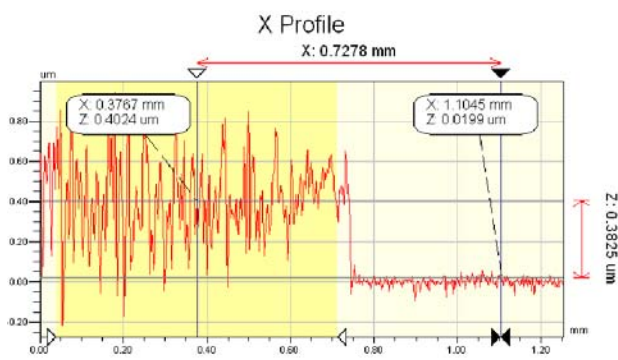


Figure IV. 19 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (380 nm, vitesse 2100 rpm), b) image 3 D de surface.

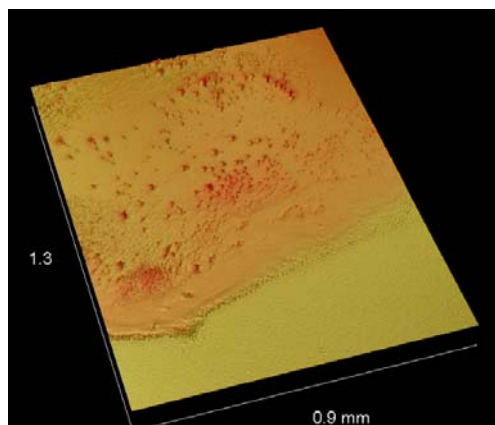


Figure IV. 20 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (500 nm, vitesse 2000 rpm), b) image 3 D de surface.

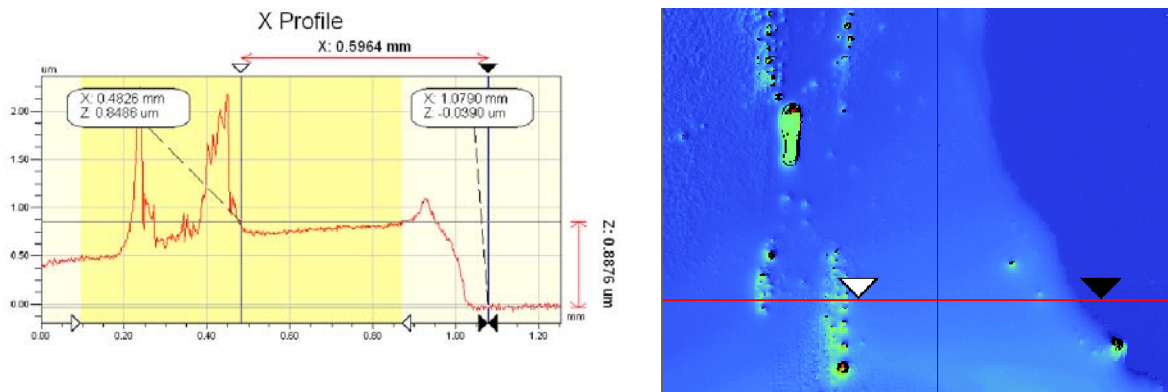


Figure IV. 21 Caractérisation par profilométrie optique a) profil 2 D du bord de la couche mince de MIP/AMP sur le capteur (800 nm, vitesse 1500 rpm), b) image 3 D de surface.

En comparaison avec les essais de dépôt par centrifugation (*spin-coating*) réalisés sans aucune procédure de prétraitement, les résultats des figures précédentes montrent que les dépôts obtenus sont homogènes et reproductibles mettant en évidence l'importance d'une étape de traitement de surface pour réaliser des dépôts de bonne qualité. L'utilisation du Kapton a toutefois engendré des effets de bord sur quelques dépôts même si celui-ci est retiré directement après le dépôt de la solution. Nous avons considéré que l'effet de cette surépaisseur localisée, étant donnée sa largeur de quelques dizaines de nanomètres par rapport à la longueur d'onde de 40 μm de la ligne à retard, était négligeable en première approximation sur la réponse du dispositif (N. Aouled-Omar, 2013).

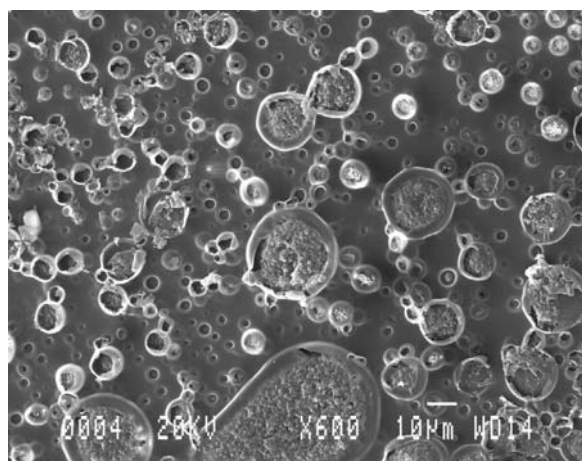
Ces tests ont ainsi démontré la faisabilité du couplage de matériau à empreinte moléculaire sur nos capteurs. Par conséquent nous avons pu procéder par la suite au test d'autres polymères à empreintes moléculaires en utilisant ce même protocole.

IV.2.2.2. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

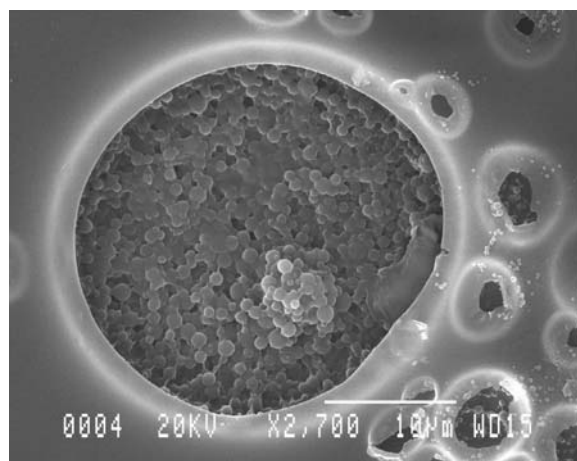
La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy* en anglais) est une technique puissante d'observation de la topographie des surfaces capable de produire des images en haute résolution d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Le principe du MEB est détaillé en annexe 3.

L'analyse par microscopie électronique à balayage a été réalisée sur des échantillons de wafer de silicium et des capteurs en utilisant le même procédé de dépôt développé dans la partie précédente. Ces clichés nous ont permis de visualiser les formes et les tailles réelles des pores des MIPs.

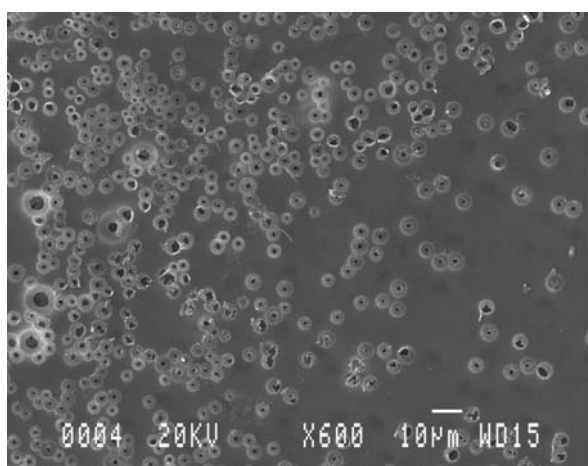
Nous avons observé que la morphologie des films (taille et densité poreuse) varie en fonction de leur épaisseur comme le montre la Figure IV. 22. En effet, nous observons clairement la présence de pores plus importants en taille et en densité pour les films d'épaisseur 1,4 μm comparé aux films plus minces d'épaisseur 200 nm.



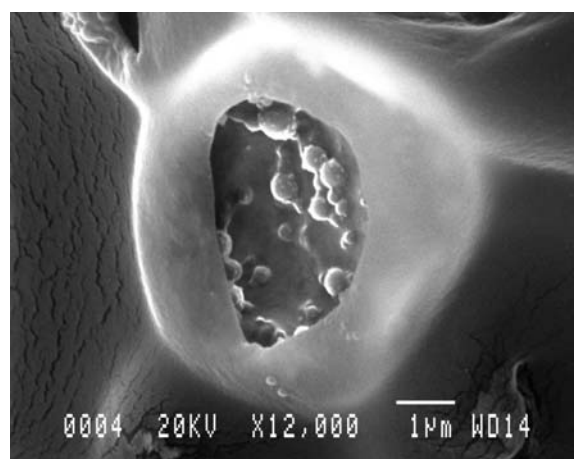
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure IV. 22 Clichés MEB de couches MIP-DMSO déposées sur des échantillons silicium avant extraction de la molécule empreinte en fonction de l'épaisseur: a) et b) 1,4 μm , c) et d) 200 nm.

Ces images mettent en évidence une séparation de phase qui a lieu rapidement au cours de la polymérisation, et génère ainsi des structures poreuses avec une large proportion de mésopores et de macropores. Cela se traduit par une augmentation du volume des vides (pore plus larges en diamètre), réduisant la surface spécifique du matériau polymérique comme on peut le voir sur la partie A de la Figure IV. 23.

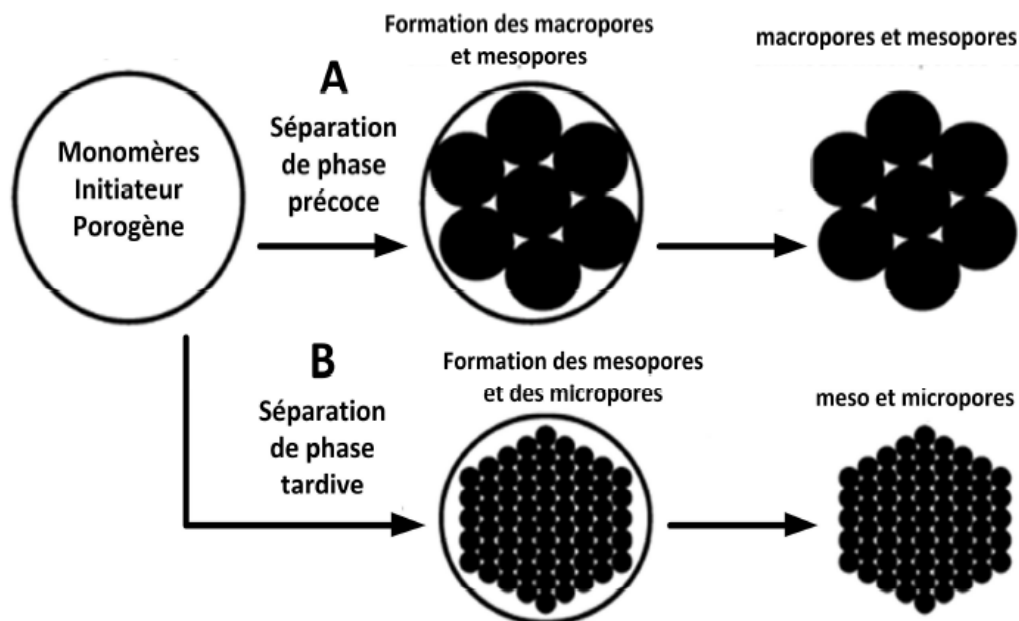
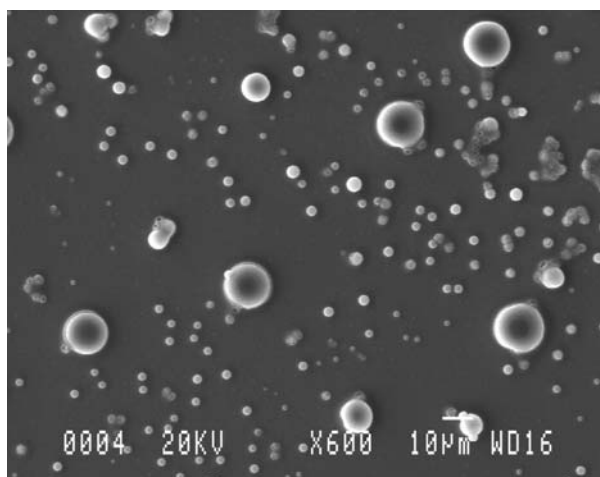


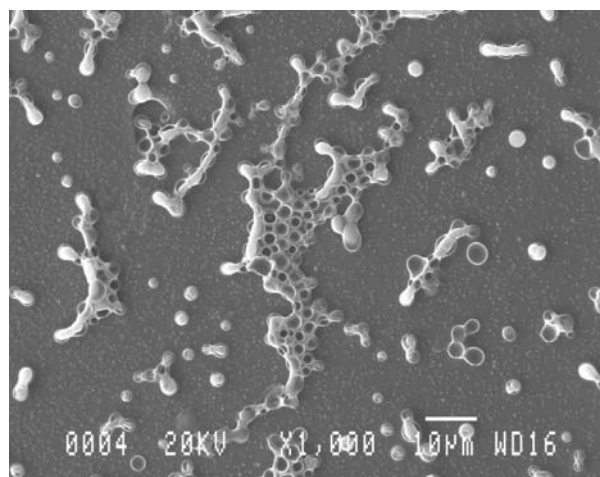
Figure IV. 23 Représentation schématique de la structure macroporeuse d'un MIP selon la nature du porogène, A) porogène à faible pouvoir solvant, B) porogène à fort pouvoir solvant (N. Omar-Aouled, 2013) adaptée de (M. H. Mohamed et al., 2012).

Un autre aspect important concerne l'effet de l'homogénéité de la solution polymère préparée sur le dépôt. En effet nous avons préparé trois solutions de MIP/AMP à base de DMSO que nous avons agitées pendant 1h, 3h et 6h. Ces solutions ont été déposées sur des capteurs acoustiques qui ont ensuite subi une extraction des empreintes AMP. La Figure IV. 24 montre l'effet du temps d'agitation de la solution sur l'homogénéité du dépôt. Ainsi, des temps de mélange plus importants produisent des solutions plus homogènes qui induisent des dépôts présentant de nombreuses cavités, celles-ci se raréfient et deviennent même inexistantes pour des temps de mélange insuffisants.

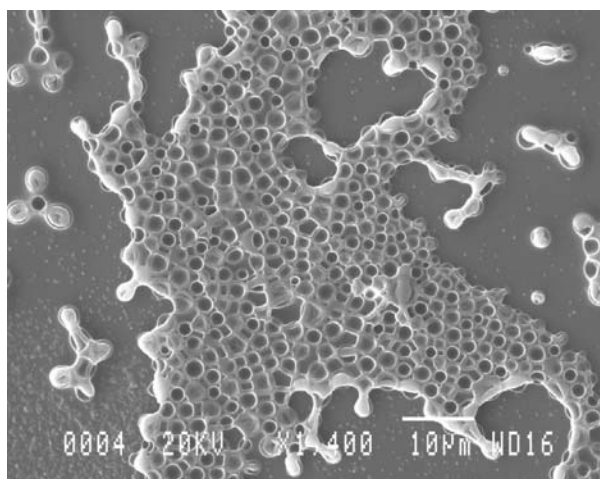
Par ailleurs, la séparation de phase pour le polymère agité pendant 6h, se produit plus tardivement et aboutit à la création d'un réseau polymérique présentant une large proportion de micropores et de mésopores comme l'illustre la Figure IV. 23 B. Ces réseaux possèdent des pores de petit diamètre (distance réduite entre les vides) et une forte surface spécifique.



(a)



(b)



(c)

Figure IV. 24 Clichés MEB de couches MIP-DMSO déposées sur des capteurs avant extraction de la molécule empreinte en fonction du temps de mélange de la solution MIP: a) 1h, b) 3h et c) 6h.

L'image MEB réalisée pour une couche mince de NIP-DMSO déposée à la surface d'un capteur est présentée dans la Figure IV. 25 (a). Ce dépôt ne possède aucune aspérité sur laquelle faire la mise au point et le film obtenu est ainsi parfaitement lisse et homogène. Le MIP de la Figure IV. 25 (b) en comparaison avec les images du polymère non imprimé (a), présente une distribution poreuse beaucoup plus importante. Cette densité et cette distribution macroporeuse sont caractéristiques du diméthylsulfoxyde (DMSO) qui est un solvant à faible pouvoir solvatant générant des mésopores et des macropores.

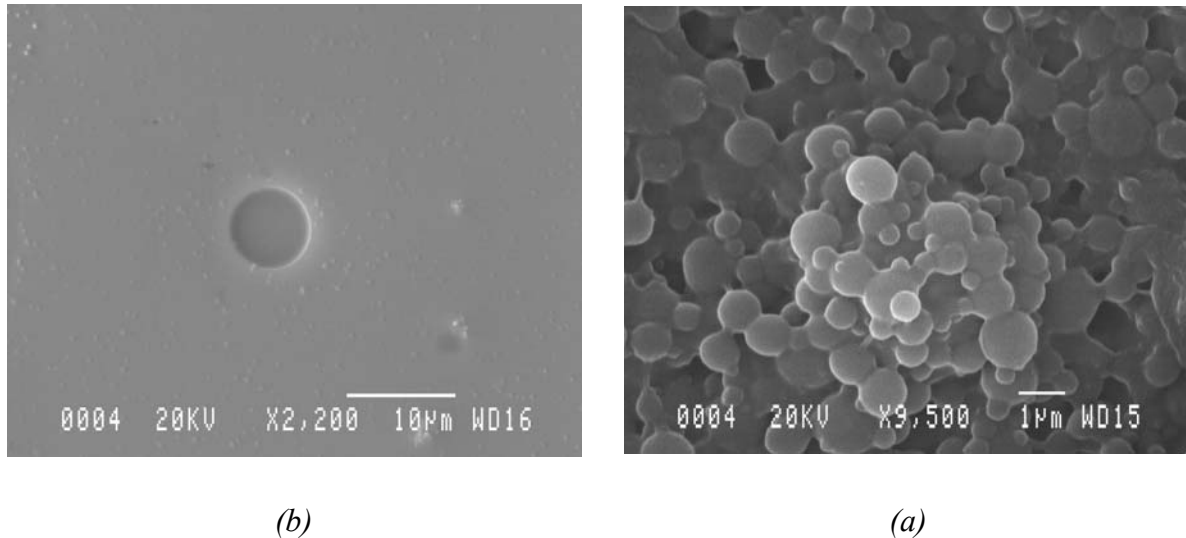


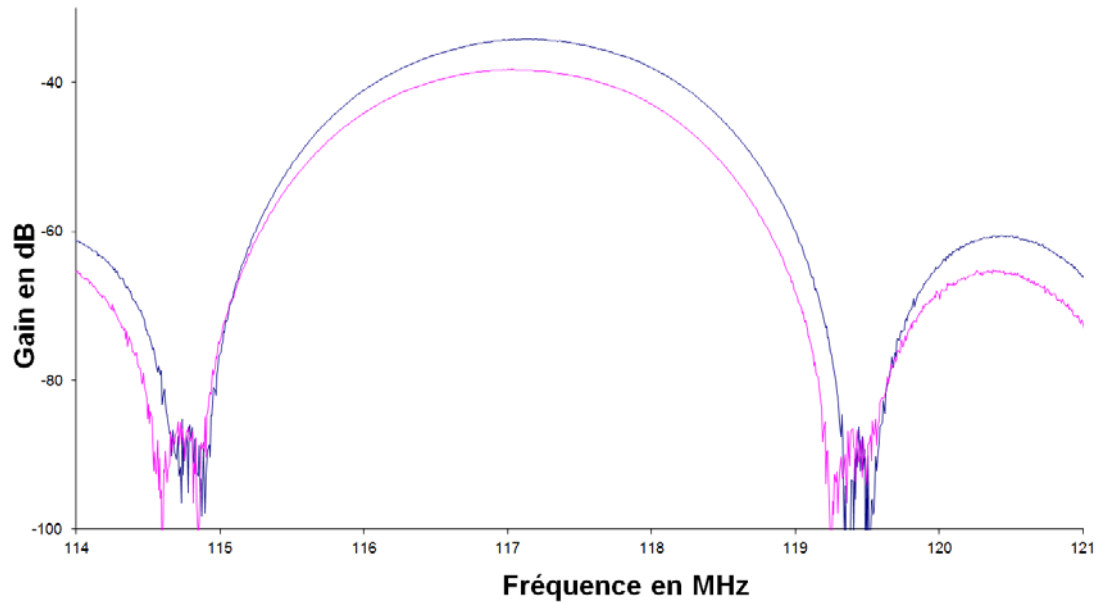
Figure IV. 25 Comparaison de deux clichés MEB d'une couche : (a) NIP-DMSO et d'une couche (b) MIP-DMSO d'une épaisseur de 1.4 μm .

IV.2.3. Compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique

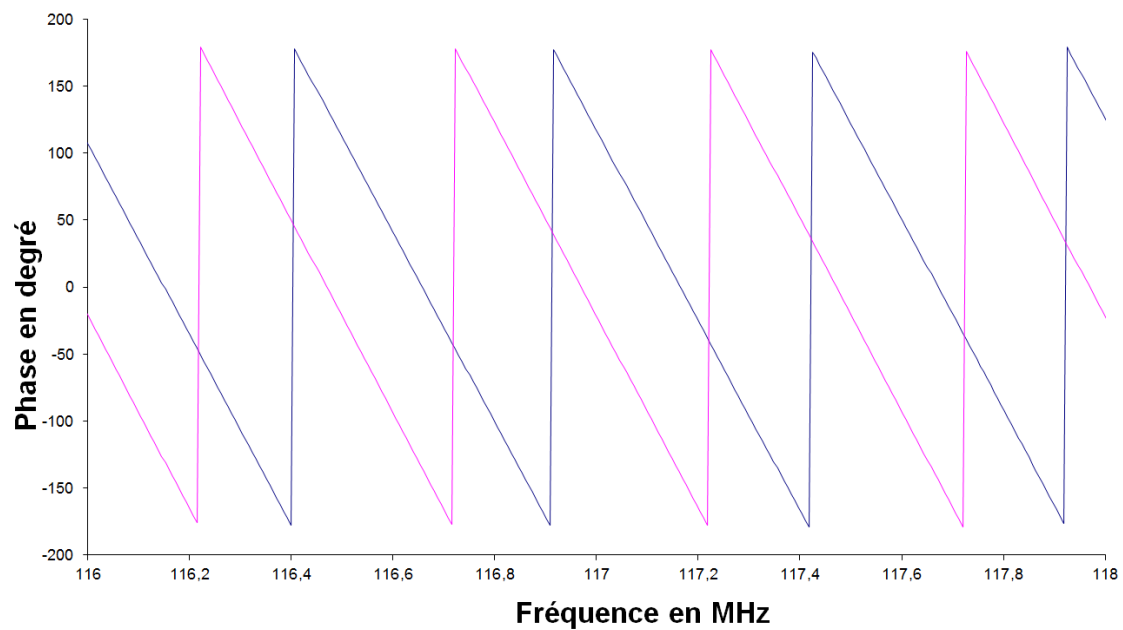
Afin de vérifier la compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique, nous avons procédé aux caractérisations électriques avant et après dépôt en utilisant l'analyseur de réseau comme nous l'avons montré au chapitre 3. En effet il est nécessaire de mesurer les paramètres S des capteurs avant le dépôt et de tracer les courbes des pertes d'insertion en fonction de la fréquence pour avoir des courbes de référence pour la suite des manipulations. Après dépôt, les paramètres S du capteur sont mesurés à nouveau, les courbes des pertes d'insertion sont tracées en fonction de la fréquence comparées à celles obtenues avant dépôt afin d'évaluer l'effet du dépôt sur la réponse du capteur.

La Figure IV. 26 montre la réponse en transmission S21 en gain et en phase du capteur avant et après dépôt pour un polymère imprimé (MIP-DMSO) d'épaisseur 500 nm. Le minimum de pertes d'insertion apparaît à la fréquence 117.2 MHz. Nous observons sur cette figure un décalage en fréquence de 199.3 kHz et une variation de 4 dB sur le gain maximum et donc une augmentation des pertes d'insertions suite au dépôt du polymère. La Figure IV. 27 représente la réponse en transmission pour une autre ligne à retard ayant subi les mêmes conditions de dépôt que le capteur précédent. Nous avons obtenu d'une part la même épaisseur de la couche mince à savoir 500 nm. D'autre part, pour ce capteur nous avons enregistré une réponse en transmission S21 avec une augmentation des pertes d'insertion estimée à 4 dB et une variation de fréquence associée de 350 kHz.

Suite au dépôt du film de MIP-DMSO d'épaisseur 500 nm, nous pouvons ainsi considérer que les dépôts étaient reproductibles et que les capteurs restaient ainsi adaptés pour une utilisation ultérieure de détection d'AMP en régime statique mais également en montage oscillateur, dans le cadre d'un fonctionnement en temps réel.

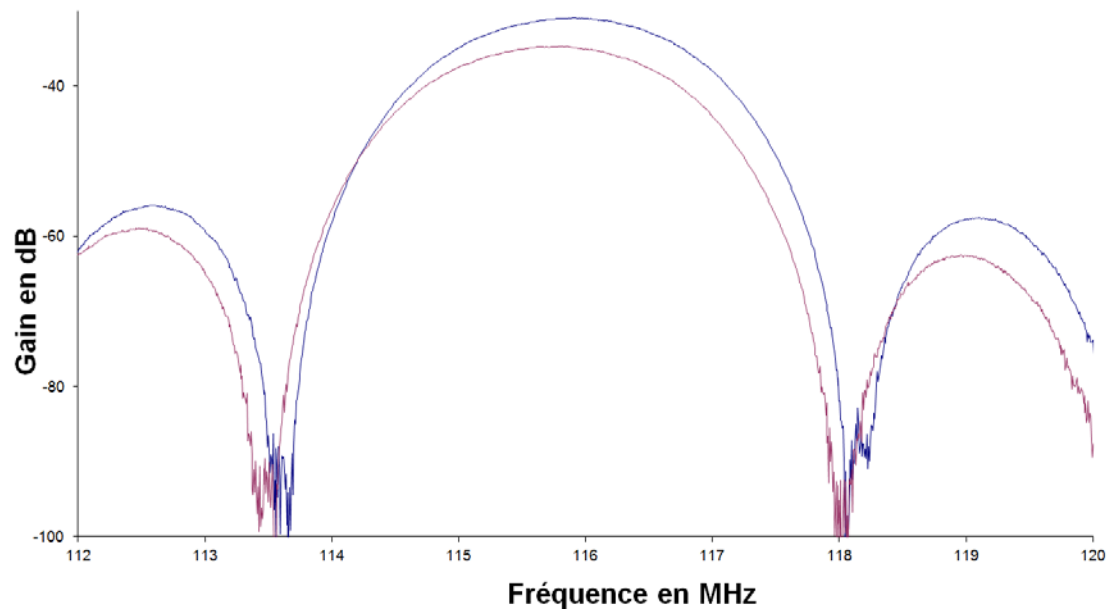


(a)

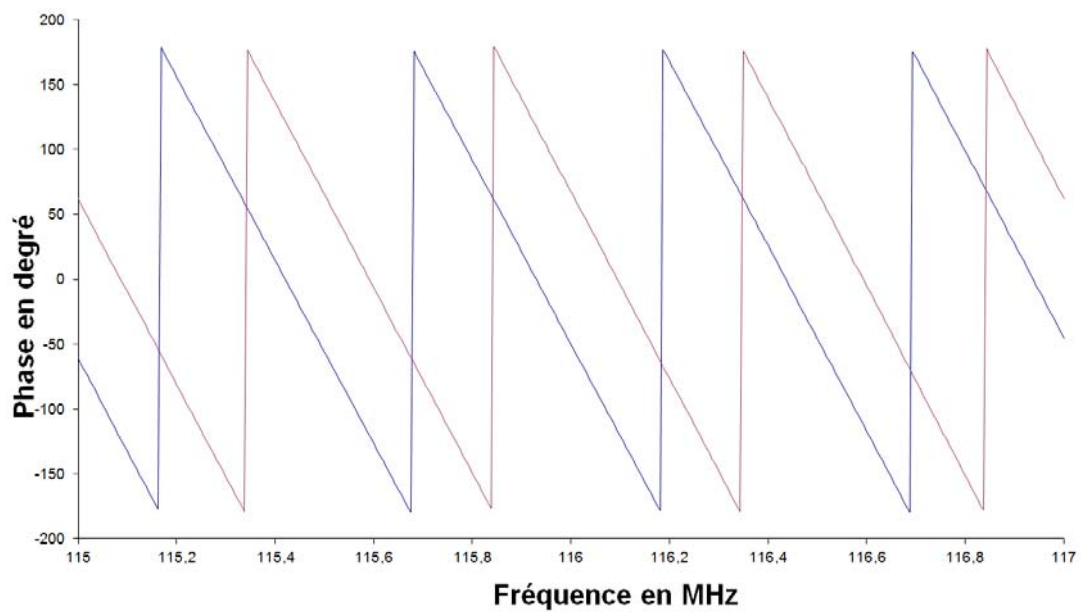


(b)

Figure IV. 26 Réponse en transmission du capteur en termes de : (a) pertes d'insertion (d), phase associée (dépôt de 500 nm d'épaisseur)



(a)



(b)

Figure IV. 27 Réponse en transmission du capteur en termes de : (a) pertes d'insertion, (d) phase associée

Des dépôts (MIP et de NIP à base d'Adénosine Mono Phosphate (AMP)) homogènes en couches minces (≤ 500 nm), limités sur la zone de propagation de l'onde de notre capteur ont donc ainsi été réalisés. Les caractérisations électriques du MIP/AMP ont montré la faisabilité de l'association du capteur à onde de Love associé aux polymères à empreintes moléculaires. Par conséquent nous avons pu procéder par la suite, en utilisant ce même protocole, au test

d'autres polymères à empreintes moléculaires visant à détecter d'autres molécules comme la pseudouridine et la 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG).

IV.3. Dépôts de couches minces du MIP pour la détection de Pseudouridine

La pseudouridine (5-β-D-ribofuranosyluracil), dont la structure chimique est représentée dans la Figure IV. 28 (a), est un type de nucléoside naturellement modifié trouvé dans les ARNt et ARNr des bactéries et des mammifères. Au cours de la croissance des cellules cancéreuses, de fortes concentrations en pseudouridine se retrouvent dans les urines. Nos partenaires de l'institut ICOA d'Orléans ont développé, dans le cadre du projet CancerSensor, un polymère à empreintes moléculaires, qui peut sélectivement et avec la sensibilité requise détecter la pseudouridine dans l'urine des patients atteints de cancer colorectal. La synthèse de ce MIP fait appel à deux monomères fonctionnels représentés dans les Figure IV. 28 (b) et (c), dont la synthèse a été réalisée en collaboration avec le Dr Andrew Hall et son équipe de l'université de Greenwich, Ecole de pharmacie Medway (Royaume-Uni). Ces polymères ont été testés et caractérisés par chromatographie HPLC (avec le MIP comme phase stationnaire) dans l'eau (H₂O) comme solvant d'élution.

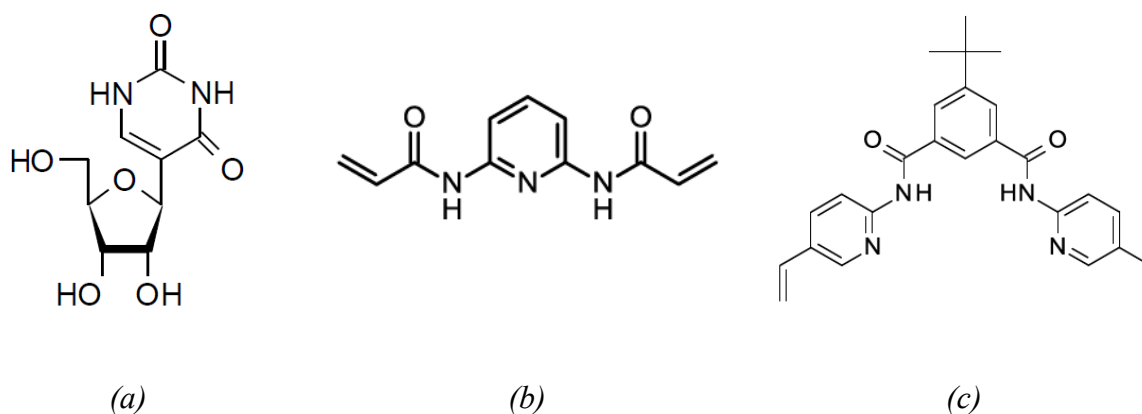


Figure IV. 28 Structure chimique du : (a) nucléoside pseudouridine, (b) monomère fonctionnel non covalent 2,6 bisacrylamidopyridine (BAAPy) et (c) monomère fonctionnel SL-118 (Patent, 2012, A. Hall)

Les premiers résultats des analyses HPLC réalisées par nos partenaires ont montré une grande différence dans la reconnaissance des polymères MIP BAAPy et le MIP HALL. Celui-ci, conserve la pseudouridine cible avec la plus grande capacité et la sélectivité par rapport aux autres nucléosides. Ce polymère a un indice de sélectivité (SI), paramètre exprimant le rapport de rétention sur le MIP et NIP, de 60. Ce comportement n'avait encore jamais été rapporté

dans la littérature. Ce MIP permet donc une extraction sélective de la pseudouridine qui est un biomarqueur de cancer.

IV.3.1. Protocole de dépôt

IV.3.1.1. MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel BAAPy

Une empreinte non-covalente analogue à la pseudouridine, 2',3',5'-O-triacyl-uridines a été utilisée en tant que “*dummy template*” (empreinte factice) pour les nucléosides pyrimidiques (voir Figure IV. 29). Le monomère fonctionnel non covalent BAAPy a été utilisé pour se lier de façon complémentaire au motif d'imide de la base et des *dummy templates* par liaison hydrogène.

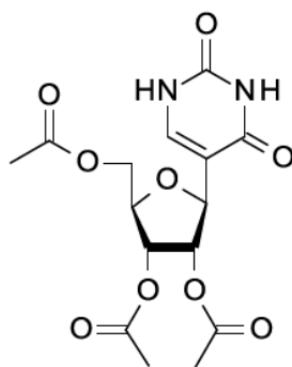


Figure IV. 29 Structure chimique de 2',3',5'-O-triacyl-uridines, molécule analogue du nucléoside pseudouridine

Dans un flacon en verre de 10 mL, sont placés 200 mg de l'empreinte TAPseu et 122 mg de monomère fonctionnel BAAPY en poudre, sont ajoutés 3.1 mL de solvant Chloroforme (CHCl_3) et 2.12 mL d'EGDM), puis la solution est agitée au vortex pendant une heure. Si les composants ne sont pas entièrement dissouts, la solution dans le flacon fermé est homogénéisée au bain ultrasons en veillant à ce que la température de la solution ne dépasse pas 30° C car le chloroforme s'évapore très rapidement. Une fois tous les composants dissouts, la solution est délicatement purgée à l'azote grâce à une aiguille fixée sur une arrivée d'azote afin d'éliminer les molécules restantes d'oxygène. Le flacon est fermé, entouré de parafilm et maintenu au réfrigérateur à une température de 4° C. Le volume total de la solution stock obtenue est 5 mL ; cette quantité nécessite 22 mg d'AIBN. Comme les dépôts sur les capteurs ne nécessitaient pas autant de quantité, nous avons prélevé 1 mL de cette

solution et recalculé la quantité d'AIBN à ajouter, soit 1/5 de 22 mg. En effet une fois l'AIBN ajouté à la solution, celle-ci doit être utilisée immédiatement. La solution est mélangée au vortex afin de dissoudre l'AIBN avant le dépôt. La formulation de la composition de la solution prépolymérisée de MIP/BAAPY ainsi que les proportions des différents réactifs utilisés sont présentés respectivement dans le Tableau IV. 5 et le Tableau IV. 6.

Tableau IV. 5 Formulation de la composition de la solution prépolymérisée de MIP/BAAPY

Réactif	M (g/mol)	P (g/mL)	Masse (g)	Volume (mL)
<i>L'empreinte</i> TAPseu	356.14		0.2	
<i>Le réticulant</i> EGDMA	198.22	1.05	2.23	2.12
<i>Le monomère fonctionnel</i> BAAPY	217	1.13	0.122	0.108
<i>Le solvant porogène</i> Chloroforme				3.1
<i>L'initiateur</i> AIBN	164.2		0.022	

Tableau IV. 6 Proportions des réactifs utilisés pour la préparation de la solution prépolymérisée de MIP/BAAPY

Proportions	<i>Empreinte</i> TAPseu	<i>Monomère</i> BAAPY	<i>Réticulant</i> EGDMA
Moles (mol)	1	1	20
Concentration (M)	$5,62 \times 10^{-4}$	$5,62 \times 10^{-4}$	$1,12 \times 10^{-2}$

IV.3.1.2. MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel HALL

Pour le protocole ci-dessous, le monomère BAAPY utilisé précédemment a été remplacé par le monomère fonctionnel HALL.

Dans un flacon en verre de 10 mL, sont placés 100 mg de l'empreinte TAPseu et 115 mg de monomère fonctionnel HALL, sont ajoutés 1.529 mL du solvant Chloroforme (CHCl_3) et 1.02 mL d'EGDMA. La suite de la préparation est identique à la précédente et permet d'obtenir 2 mL de solution stock dont 1 mL a été prélevé dans lequel a été ajouté $\frac{1}{2}$ de 11 mg d'AIBN. La formulation de la composition de la solution prépolymérisée de MIP/HALL ainsi que les proportions des différents réactifs utilisés sont présentés respectivement dans le Tableau IV. 7 et le Tableau IV. 8.

Tableau IV. 7 Formulation de la composition de la solution prépolymérisée de MIP/HALL

Réactif	M (g/mol)	P (g/mL)	Masse (g)	Volume (mL)
<i>L'empreinte</i> TAPseu	370.31		0.1	
<i>Le réticulant</i> EGDMA	198.22	1.05	1.07	1.02
<i>Le monomère fonctionnel</i> HALL	426.51	1.015	0.115	0.113
<i>Le solvant porogène</i> Chloroforme				1.529
<i>L'initiateur</i> AIBN	164.2		0.011	

Tableau IV. 8 Proportions des réactifs utilisés pour la préparation de la solution prépolymérisée de MIP/HALL

Proportions	<i>Empreinte</i>	<i>Monomère</i>	<i>Réticulant</i>
	TAPseu	BAAPY	EGDMA
Moles (mol)	1	1	20
Concentration (M)	$2,7 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-3}$

IV.3.1.3. Dépôt

Avant l'étape de dépôt à la tournette, les capteurs utilisés ont subi le même traitement que les capteurs utilisés pour les dépôts du MIP/AMP selon le protocole détaillé en Annexe 2. Les deux solutions MIP/BAAPY (Chloroforme) et MIP/HALL (Chloroforme) ont été déposées sur des capteurs ainsi que sur des échantillons de silicium pour la caractérisation de la morphologie de surface des dépôts.

IV.3.1.4. Polymérisation

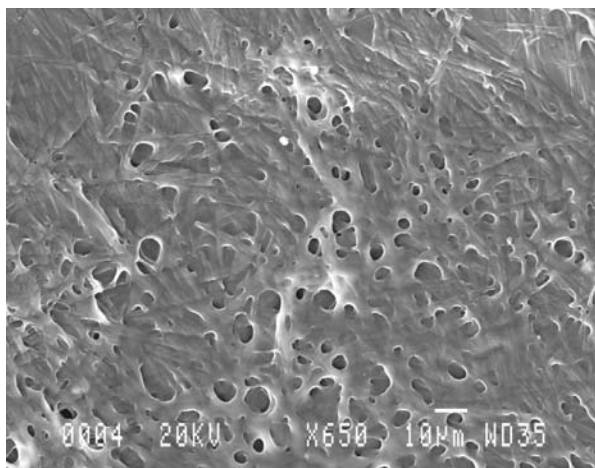
Afin de polymériser les dépôts de couches de MIP/ BAAPY et le MIP/ HALL, nous avons eu recours au même dispositif utilisé pour la polymérisation des MIPs/AMP. Les capteurs ainsi que les échantillons silicium recouverts de dépôts sont disposés à 6 cm de la lampe UV réglée pour un rayonnement à 365 nm pendant une heure. Un flux d'azote circulait en permanence dans la chambre de polymérisation afin d'éliminer l'oxygène du milieu qui pourrait inhiber la polymérisation car l'initiateur AIBN forme des radicaux stables avec l'oxygène. Tous ces paramètres sont résumés dans le Tableau IV. 9 Paramètres retenus pour les dépôts de MIP/Pseudouridine à base des monomères fonctionnels BAAPY et HALL. Tableau IV. 9.

Tableau IV. 9 Paramètres retenus pour les dépôts de MIP/Pseudouridine à base des monomères fonctionnels BAAPY et HALL.

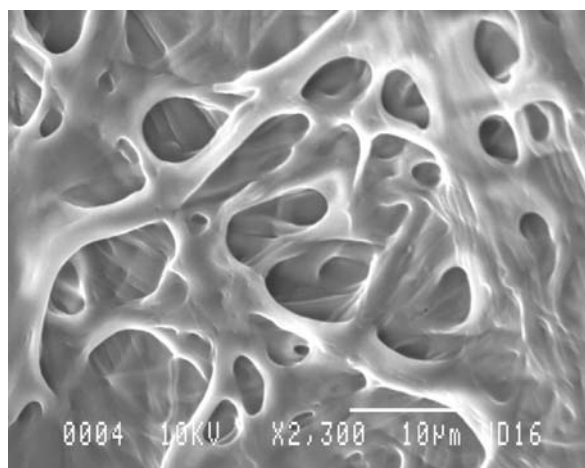
<i>Substrat</i>	<i>Vitesse Accélération Temps</i>	<i>Quantité Solution</i>	<i>Polymérisation</i>	<i>Epaisseur moyenne homogénéité</i>
Capteur	3000 rpm	10µl	Polymérisation UV à 365nm pendant 3h sous atmosphère inerte	~500 nm
	4000 rpm			Dépôt
	10s			homogène
Echantillons en silicium (1×1 cm)	3000 rpm 4000 rpm/s 10s	10µl	Polymérisation UV à 365nm pendant 3h sous atmosphère inerte	(non mesurés)

IV.3.2. Caractérisation des couches minces du MIP-pseudouridine par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

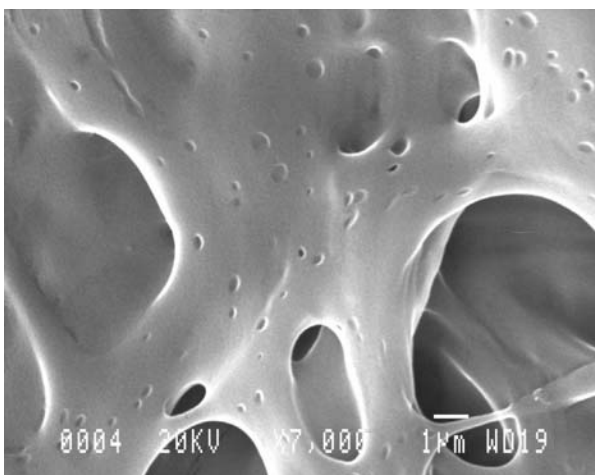
L'analyse par microscopie électronique à balayage a été réalisée sur des échantillons de wafer de silicium et des capteurs en utilisant le même procédé de dépôt développé dans la partie précédente. Ces clichés nous ont permis de visualiser les formes et les tailles réelles des pores des MIPs. Les clichés de la Figure IV. 30 représentent différents agrandissements de couches MIP-Chloroforme d'une épaisseur de 1 µm pour la détection de pseudouridine déposées sur des échantillons de silicium avant extraction de la molécule empreinte. Ces images révèlent la présence de macropores dans le polymère qui contrairement au MIP/AMP ne présente pas de problème de séparation de phase du solvant.



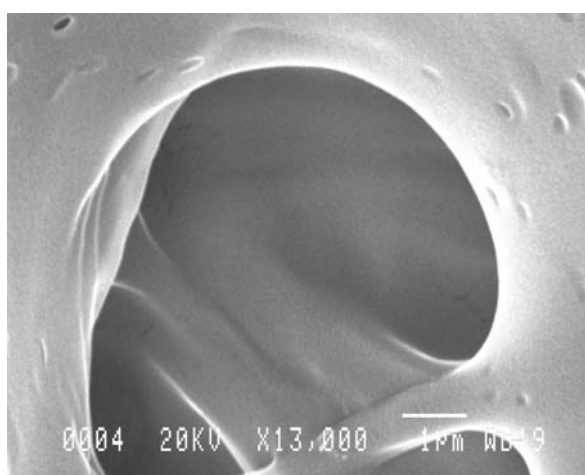
(a)



(b)



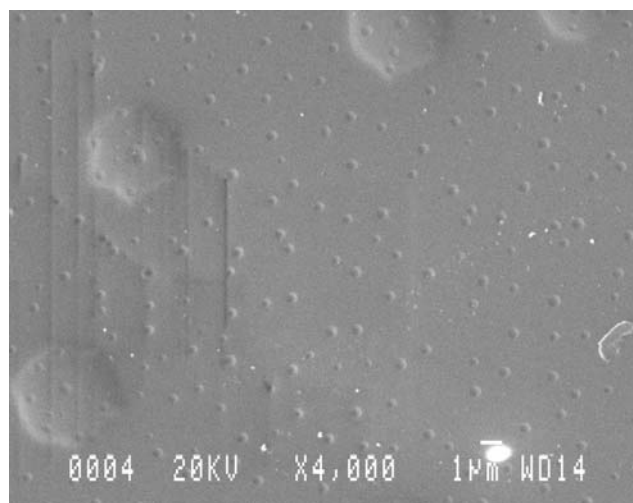
(c)



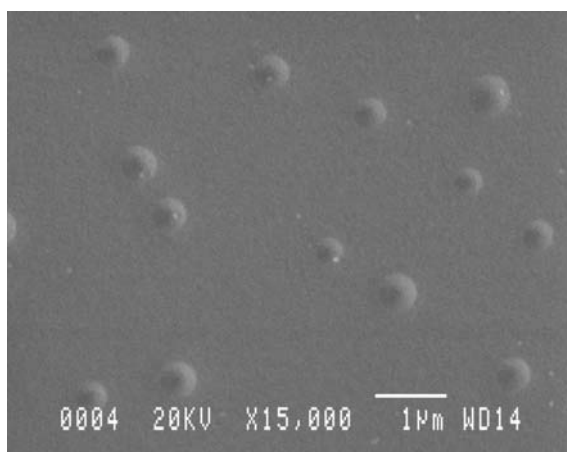
(d)

Figure IV. 30 Clichés MEB avec différents agrandissements de couches MIP-Chloroforme pour la détection de Pseudouridine déposées sur des échantillons en silicium avant extraction de la molécule empreinte (1µm).

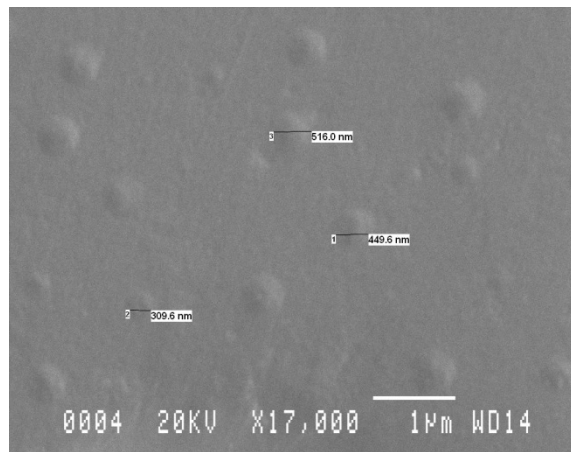
Nous avons observé que la morphologie des films (taille et densité poreuse) varie en fonction de leur épaisseur comme le montre la Figure IV. 31. En effet, nous observons clairement la présence de pores moins importante en taille et en densité pour les films d'épaisseur de 200 nm déposés sur les capteurs, comparé aux films d'épaisseur 1 µm de la Figure IV. 30 déposés sur des échantillons en silicium. Pour nos essais de caractérisation électrique en régime statique, les mesures ont été réalisées pour des épaisseurs allant de 400 nm à 1µm.



(a)



(b)



(c)

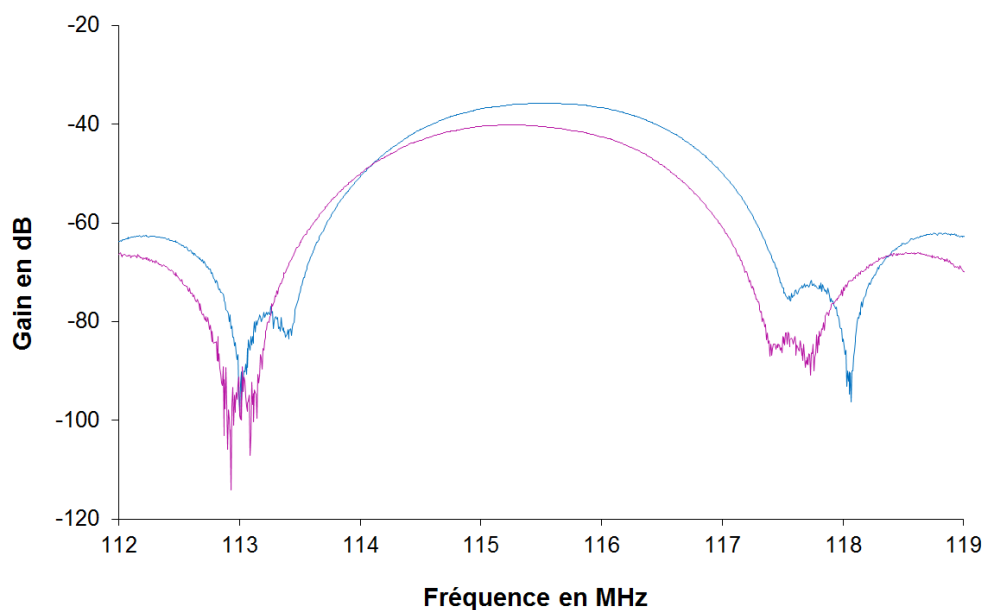
Figure IV. 31 Clichés MEB avec différents agrandissements de couches MIP-Chloroforme pour la détection de Pseudouridine déposées sur des capteurs avant extraction de la molécule empreinte (200 nm).

IV.3.3. Compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique

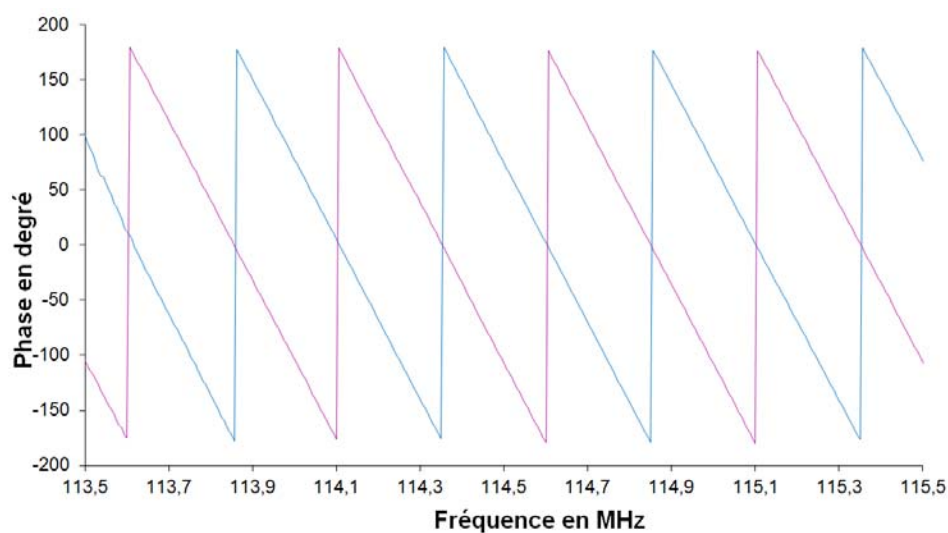
Afin de vérifier la compatibilité des dépôts de MIP/Pseudouridine à base des monomères fonctionnels BAAPY et HALL, avec la propagation de l'onde acoustique sur le chemin de propagation du capteur, nous avons procédé aux caractérisations électriques avant et après dépôt de ces polymères. Nous avons ainsi comparé les paramètres S et tracé les courbes des pertes d'insertion en fonction de la fréquence pour chacune de ces étapes.

IV.3.3.1. MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel BAAPy

La Figure IV. 32 représente la réponse en phase du capteur et les pertes d'insertion associées. Lors du dépôt, on enregistre une diminution de fréquence correspondante à 256 kHz pour le capteur, compatible avec une augmentation de masse liée. Les pertes d'insertions engendrées par le dépôt étaient estimées à 6 dB.



(a)

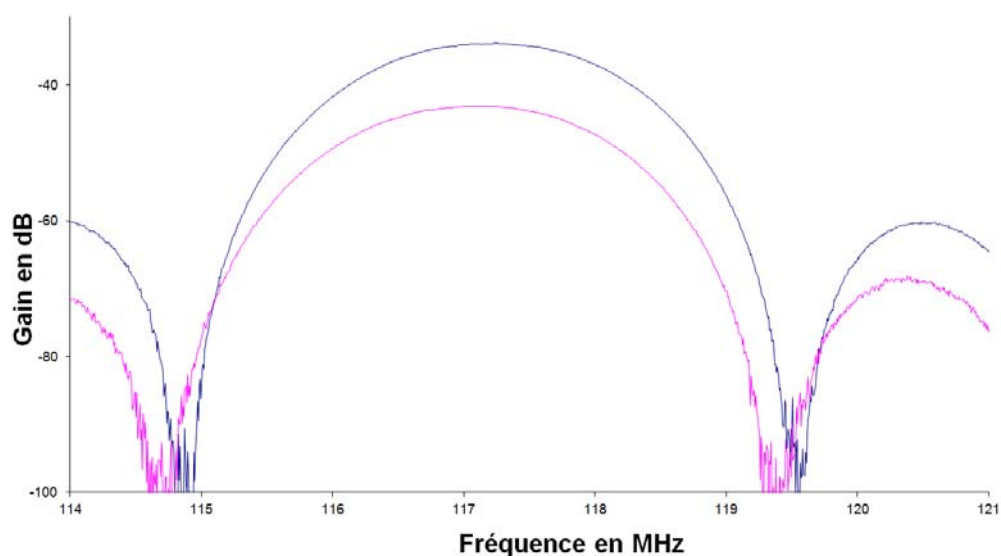


(b)

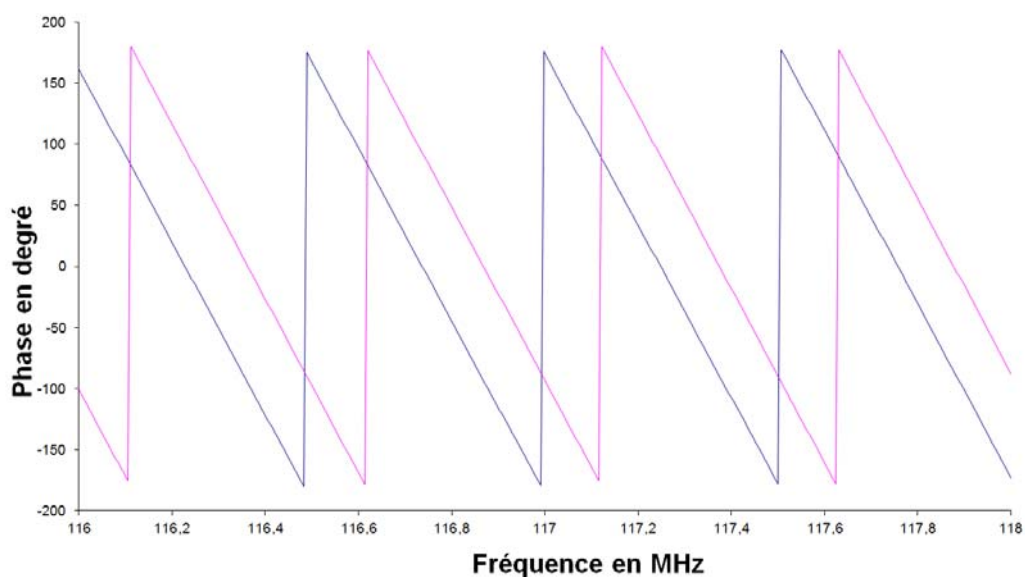
Figure IV. 32 (a) Réponse en phase du capteur (b) Pertes d'insertion associées

IV.3.3.2. MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel HALL

La Figure IV. 33 représente la réponse en phase du capteur et les pertes d'insertion associées. Lors du dépôt, on enregistre une diminution de fréquence correspondante à 123.7 kHz pour le capteur, compatible avec une augmentation de masse liée. Les pertes d'insertions engendrées par le dépôt étaient estimées à 10 dB.



(a)



(b)

Figure IV. 33 (a) Réponse en phase du capteur (b) Pertes d'insertion associées au même capteur

Ces tests ont mis en évidence la compatibilité des MIPs/Pseudouridine à base des monomères fonctionnels BAAPY et HALL avec le capteur acoustique et la possibilité de leur utilisation pour les tests de détection de pseudouridine en régime statique dans la suite des travaux.

IV.4. Dépôts de couches minces du MIP pour la détection de 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG)

La molécule 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG) représentée dans la Figure IV. 34 est un produit majeur formé par l'attaque du radical de l'hydroxyle contre les résidus guanine de l'ADN. Cette molécule a été largement utilisée comme biomarqueur des lésions oxydatives de l'ADN. Les mesures des niveaux de 8-OHdG dans les échantillons d'urine sont délicates en raison de leurs faibles quantités et la complexité de la matrice de biomarqueurs.

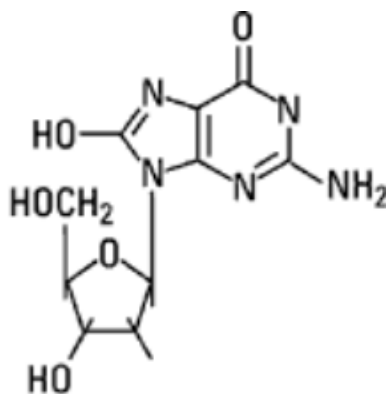


Figure IV. 34 Structure chimique du biomarqueur 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG)
www.sigmaaldrich.com.

Les lésions oxydatives de l'ADN dans les cellules causées par des espèces réactives à l'oxygène "*reactive oxygen species*" (ROS) est un processus bien documenté. Les organismes vivants sont constamment exposés aux ROSs, générés par des réactions biochimiques normales et divers facteurs externes relatif au mode de vie et à l'environnement comme la consommation de cigarette et la pollution. Les lésions oxydatives de l'ADN ont également été impliquées dans la pathophysiologie d'une grande variété de maladies chez l'humain dont le cancer, les désordres neurodégénératives, et le vieillissement.

Comme les oxydants réactifs ne sont pas appropriés aux analyses, les bases oxydées comme la 8-OHdG sont utilisées comme biomarqueurs des lésions oxydatives de l'ADN. Quelques cellules cancéreuses peuvent produire de grandes quantités de H_2O_2 . Les enzymes antioxydants comme les superoxide dismutase et catalase se dégradent également dans les

cellules cancéreuses. D'autres études ont conclu que divers types de tissus cancéreux, comme les carcinomes du poumon ou des reins, montrent des niveaux élevés d'oxydation d'ADN par rapport aux tissus normaux de contrôle correspondants qui se traduisent par des niveaux élevés de 8-OHdG. Par ailleurs, la quantité du biomarqueur 8-OHdG augmente progressivement avec l'âge. Toutefois, ces quantités sont nettement plus importantes chez les malades d'Alzheimer (A. Eröz *et al.* 2008).

Diverses méthodes analytiques ont été développées pour la détermination de 8-OHdG dont la plupart sont à base d'électrophorèse capillaire, d'analyse HPLC et des méthodes ELISA. Ces méthodes sont bien évidemment coûteuses et requièrent une étape fastidieuse de prétraitement.

A. Eröz *et al.* ont proposé un polymère à empreinte moléculaire pour la reconnaissance et la quantification de 8-OHdG grâce à un nouveau monomère chélateur métallique methacryloylamidohistidine-platinum(II) [MAH-Pt(II)] (A. Eröz *et al.* 2008). L'étude comprenait une extraction en phase solide "*solid-phase extraction*" (SPE) d'échantillons de sang par le nouveau polymère préparé en forme volumique "*bulk*" ainsi que des mesures par une microbalance à quartz associée au polymère en couche minces. Les résultats de cette étude ont révélé que le niveau de 8-OHdG est élevé chez les patients atteints de cancer 0.280 μM par rapport aux sujets sains 0.0138 μM . Pour la polymérisation, 0.50 mmol du complexe monomère/empreinte (MAH-Pt(II)/8-OHdG), 0.35 mmol de réticulant (N-N méthylènebisacrylamide) et 0.25 mmol d'initiateur ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5/\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ont été mélangés dans 1mL d'eau comme le montre la Figure IV. 35. Le mélange a été dégazé, déposé sur l'électrode de la microbalance à quartz et polymérisé pendant 4 heures sous UV.

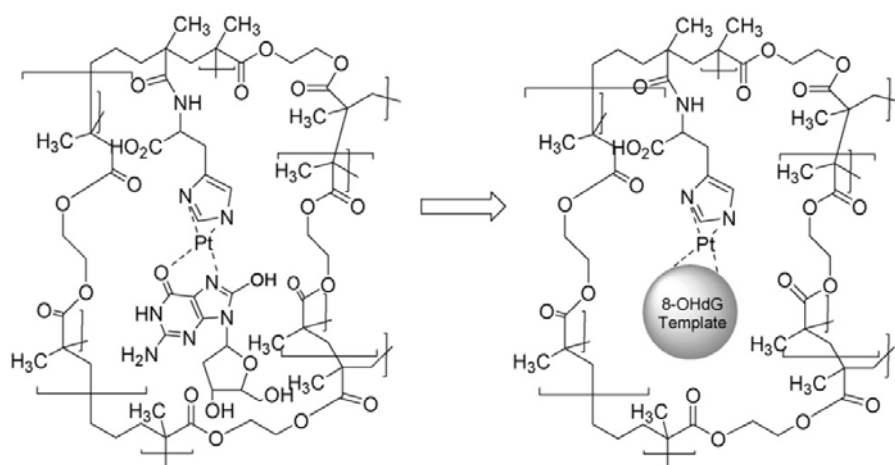


Figure IV. 35 représentation schématique de la formation du polymère autour de la molécule empreinte 8-OHdG (A. Eröz *et al.* 2008).

Pour nos travaux, l'élaboration des couches minces de MIP/8-OHdG a été réalisée en collaboration avec la doctorante Aleksandra Krstulja lors d'un déplacement pour une série de tests qu'elle a effectué au laboratoire IMS de Bordeaux. Pour ce polymère, nous nous sommes inspirés des travaux de S-W. Zhang *et al.* qui avaient développé un MIP en colonnes capillaires pour la détection de 8-OHdG dans les urines (S-W. Zhang *et al.*, 2009). Des tests de microextraction en phase solide couplés à des analyses HPLC/UV ont permis de vérifier la capacité de recapture de ce MIP qui a démontré une grande capacité de recapture ainsi qu'une bonne sélectivité envers la 8-OHdG avec une limite de détection estimée à 3.2 nmol/L. Zhang *et al.* ont testé ce MIP avec des échantillons d'urines de sujets sains et de patients atteints de cancer. Le niveau de 8-OHdG dans les urines des malades atteints de cancer était élevé par rapports aux sujets sains.

IV.4.1. Protocole de dépôt

IV.4.1.1. Préparation de la solution prépolymérisée

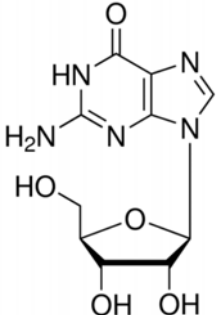
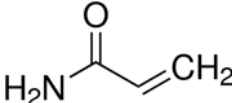
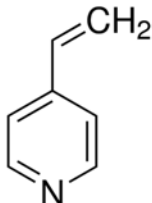
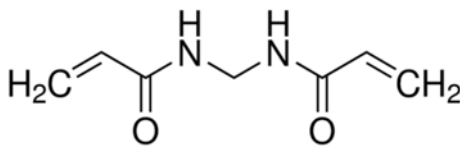
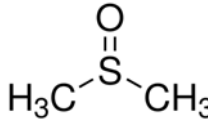
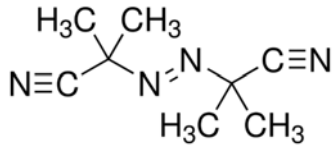
Etant donné le prix élevé du 8-OHdG (246 euros/5 mg), la guanosine a été désignée comme molécule empreinte et la 8-OHdG comme molécule cible. La molécule guanosine a été sélectionnée comme analogue à la 8-OHdG car elle possède la même formule chimique ($C_{10}H_{13}O_5N_5$) ainsi que les mêmes groupes fonctionnels que le marqueur 8-OHdG. La seule différence est la position d'un seul groupe OH. Le polymère à empreinte moléculaire a été préparé comme suit :

L'empreinte guanosine, les monomères fonctionnels (acrylamide et 4-vinylpyridine) et le réticulant (N,N-méthylène bisacrylamide) ont été dissouts dans 350 mg de DMSO et 280 mg de dodecanol. La solution était agitée dans un bain ultrasons à 50° C pendant 10 min puis purgée à l'azote pendant 5 minutes pour évacuer l'excès d'oxygène. L'initiateur (AIBN) a été ajouté au mélange et la solution a été encore agitée pendant 10 autres minutes. Les différents réactifs utilisés pour la préparation d'une solution stock de MIP/8-OHdG et leurs structures chimiques sont représentés dans le Tableau IV. 10. Une solution de polymère non imprimé a été préparée en suivant le même protocole. Par ailleurs, une autre solution de polymère à empreinte moléculaire a été préparée avec le DMSO comme unique solvant porogène.

La molécule 8-OHdG est un acide faible en raison du groupement hydroxyle phénolique, c'est pour cette raison que des monomères fonctionnels avec des groupes basiques tels que l'acrylamide, le 4-vinylpyridine et le réticulant N,N-méthylène bisacrylamide ont été choisis

afin de renforcer les interactions entre les empreintes et les monomères. Lors de la polymérisation du MIP, un analogue structural utilisé comme une molécule empreinte factice était favorable pour éviter la fuite des molécules empreintes et ce particulièrement lors de l'extraction en phase solide.

Tableau IV. 10 Les différents réactifs utilisés pour la préparation d'une solution stock de MIP/8-OHdG et leurs structures chimiques

Nom du réactif	Structure chimique <i>www.sigmaaldrich.com</i>	Quantité
Template Guanosine		17.5 mg
Monomère fonctionnel (Acrylamide)		56 mg
Monomère fonctionnel 4-vinylpyridine		38 mg
Réticulant N,N-methylene bisacrylamide		63 mg
Solvant porogène Dimethyl sulfoxide (DMSO)		350 mg
Solvant porogène dodecanol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OH}$	280 mg
Initiateur 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN)		2 mg

La sélection du solvant de polymérisation est très importante car un bon solvant augmente la solubilité des composants dans le mélange prépolymérisé. Afin d'augmenter la quantité de guanosine dans le mélange, divers solvants ont été testés : Le DMSO, le toluène, le benzène, le dichlorométhane, le chloroforme et l'acétone. Le DMSO est apparu comme le meilleur solvant pour dissoudre la guanosine comparé aux autres solvants qui ont montré un faible pouvoir solubilisant.

IV.4.1.2. Dépôt

Avant l'étape de dépôt à la tournette, les capteurs utilisés ont subi le même traitement que les capteurs utilisés pour les dépôts du MIP/AMP suivant le protocole expérimental détaillé en Annexe 2. Les trois solutions MIP/Guanosine (DMSO-dodecanol), NIP (DMSO-dodecanol) et MIP/ Guanosine (DMSO) ont été déposées sur des capteurs ainsi que sur des échantillons de silicium pour la caractérisation de la morphologie de surface des dépôts.

IV.4.1.3. Polymérisation

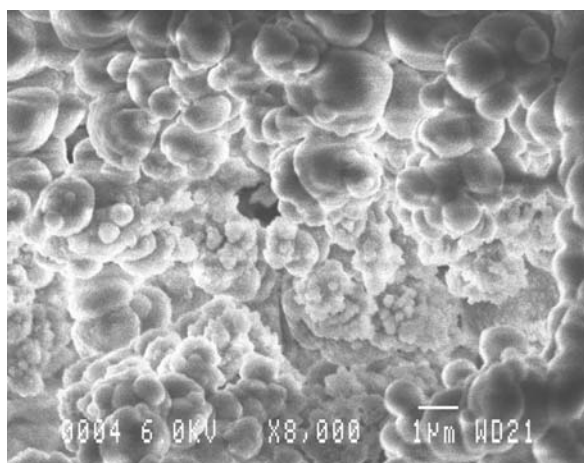
Afin de polymériser les dépôts de couches de MIP/ Guanosine, nous avons eu recours au même dispositif utilisé pour la polymérisation des MIPs/AMP. Les étapes de polymérisation sont détaillées en Annexe 2. Le Tableau IV. 11 représente les paramètres retenus pour les dépôts de MIP/HALL.

Tableau IV. 11 Paramètres retenus pour les dépôts de MIP/HALL

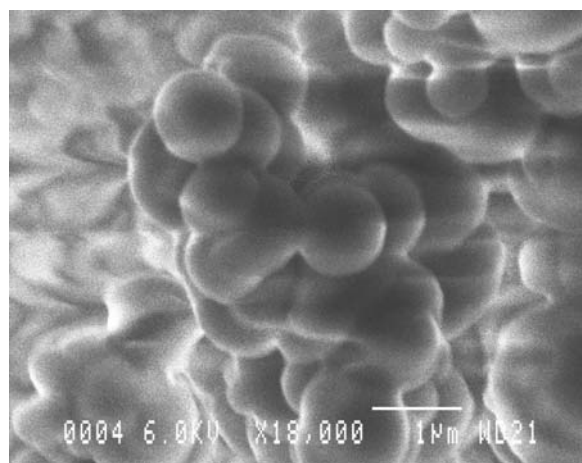
<i>Substrat</i>	<i>Vitesse Accélération Temps</i>	<i>Quantité Solution</i>	<i>Polymérisation</i>	<i>Epaisseur moyenne homogénéité</i>
Capteur	2000 rpm	10µl	Polymérisation UV à 365nm pendant 3h sous atmosphère inerte	~500 nm
	4000 rpm			Dépôt
	10s			homogène
Echantillons en silicium (1×1 cm)	2000 rpm 4000 rpm/s 10s	10µl	Polymérisation UV à 365nm pendant 3h sous atmosphère inerte	—

IV.4.2. Caractérisation des couches minces du MIP- 8-hydroxy-2'deoxyguanosine par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Comme précédemment l'observation microscopique de la surface des polymères à empreintes moléculaires obtenue dans ces conditions a été réalisée par MEB. La Figure IV. 36 permet d'observer la présence d'une structure poreuse avec des sections de pores de dimensions différentes dans les couches minces de MIP. La porosité du polymère non imprimé représenté dans la Figure IV. 37 n'est en apparence pas très différente de celle du MIP. Les essais HPLC réalisés par S-W. Zhang *et al.* ont révélé que ce même MIPs déposé sur les parois des capillaire avait une plus forte capacité de recapture des molécules 8-OHdG comparé au NIP. Cela montre qu'au-delà de l'effet géométrique de l'empreinte, un autre aspect important dans l'impression moléculaire est l'interaction chimique entre l'empreinte et les monomères fonctionnels (L. Zhao *et al.*, 2011).

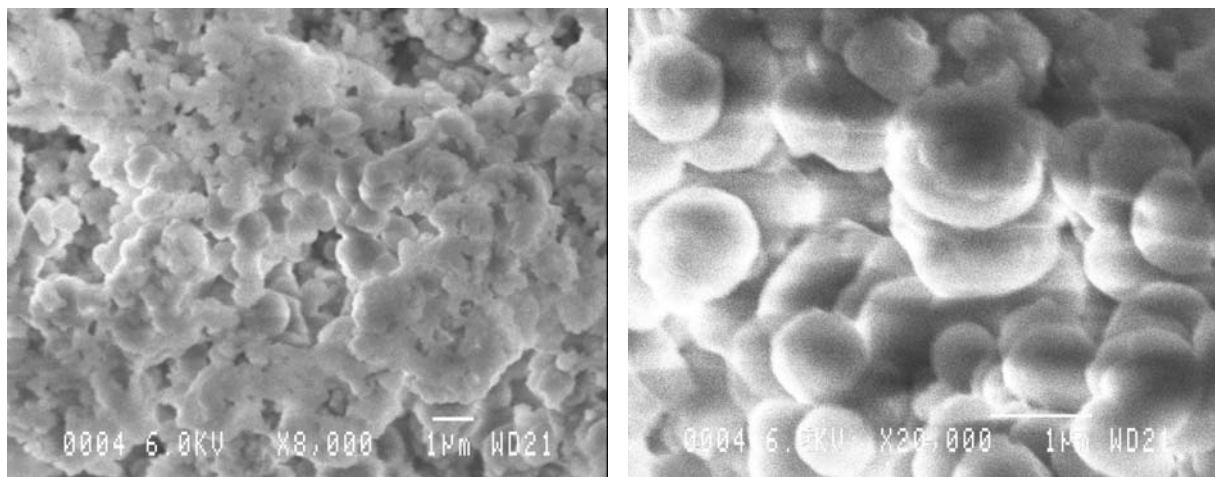


(c)



(d)

Figure IV. 36 Clichés MEB avec différents agrandissements de couches MIP-DMSO pour la détection de 8-OHdG déposées sur des échantillons en silicium avant extraction de la molécule empreinte guanosine : (a) $\times 8000$, (b) $\times 20000$.



(a)

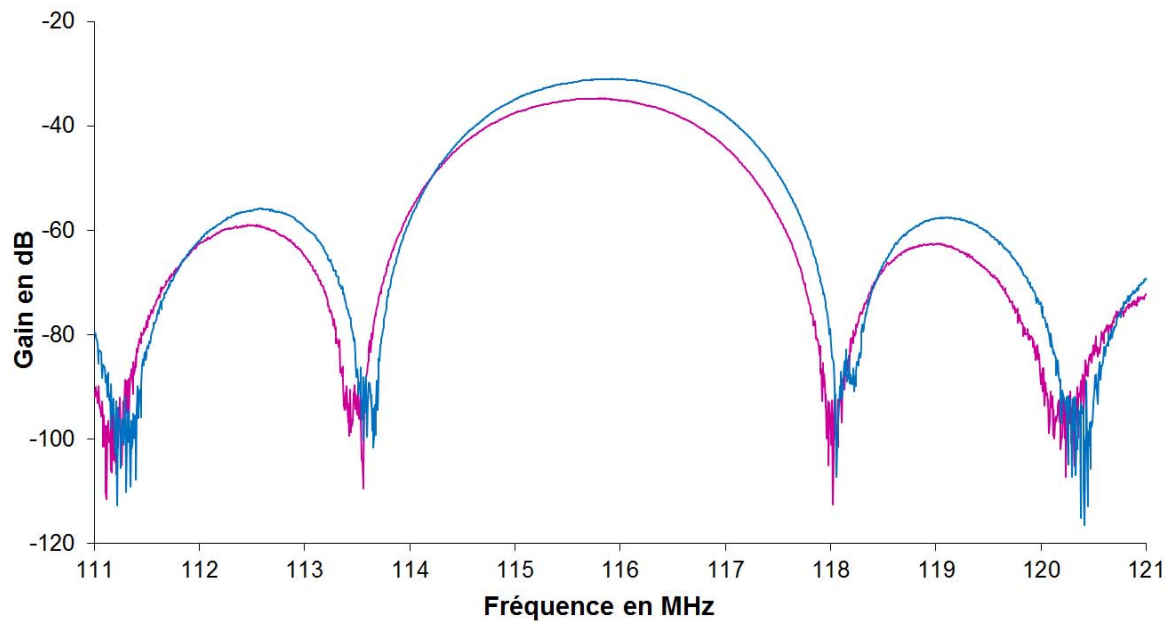
(b)

Figure IV. 37 Clichés MEB avec différents agrandissements de couches NIP-DMSO pour la détection de 8-OHdG déposées sur des échantillons en silicium avant extraction de la molécule empreinte guanosine : (a) $\times 8000$, (b) $\times 20000$.

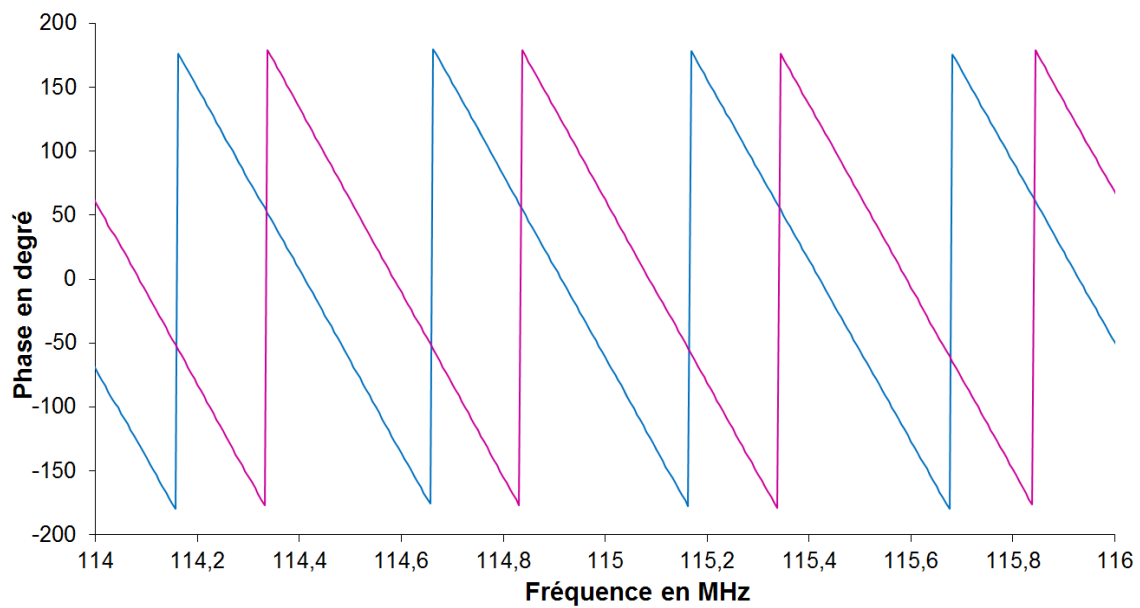
IV.4.3. Compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique

Afin d'étudier l'influence des dépôts de couche mince de MIP/guanosine, placés sur le chemin sensible du capteur à onde acoustique, celui-ci est inséré dans la cellule de test afin de mesurer, à l'analyseur de réseau, la réponse en transmission S21 des capteurs avant et après dépôt du MIP.

La Figure IV. 38 montre la réponse en transmission S21 en gain et en phase du capteur avant et après dépôt pour un polymère imprimé (MIP/guanosine) d'épaisseur 700 nm. Le minimum de pertes d'insertion apparaît à la fréquence 116 MHz. Nous observons sur cette figure un décalage en fréquence de 175 kHz et une variation de 5 dB sur le gain maximum associé à une augmentation des pertes d'insertions suite au dépôt du polymère.



(a)



(b)

Figure IV. 38 Réponse en transmission S_{21} du capteur avant et après dépôt du MIP (Epaisseur 500 nm) (a) Pertes d'insertion et (b) réponse en phase du capteur

Du fait de ces pertes d'insertion assez importantes, nous pouvons considérer que les dépôts étaient reproductibles mais les capteurs restaient adaptés uniquement pour une utilisation ultérieure de détection d'AMP en régime statique. La réalisation de films plus minces n'a pu être abordée à défaut de temps.

IV.5. Conclusion

Une étude bibliographique et technique préalable, a abouti au choix d'une technique de dépôt par centrifugation (« spin-coating »), une méthode courante pour produire un film mince et uniforme sur un substrat. Dans un premier temps, il a fallu adapter le protocole de préparation volumique des solutions MIP/AMP et NIP, et trouver les paramètres de dépôt appropriés à savoir, la vitesse l'accélération, le temps et la quantité ainsi que les conditions optimales de polymérisation afin de réaliser des films en couches minces (< 500 nm) localisés sur la zone de propagation d'onde de notre capteur à ondes acoustiques. La polymérisation est réalisée en absence d'oxygène, par une technique d'insolation sous Ultraviolet dans une chambre inerte, sous circulation d'azote pendant toute la durée de la polymérisation. Aussi, nous avons eu recours à une technique de masquage par kapton pour limiter le dépôt sur la zone de propagation. D'autre part, il est apparu nécessaire de trouver un traitement de surface adapté pour que la solution adhère au substrat. Ainsi, nous avons procédé à une fonctionnalisation de la surface par mélange piranha qui élimine les résidus organiques et régénère par oxydation les groupes hydroxyles (groupes OH), suivie d'une silanisation qui permet d'obtenir une polymérisation homogène par greffage covalent du polymère. Enfin, nous avons un problème d'homogénéité du film auquel nous avons remédié par des changements de la viscosité de la solution et des paramètres de dépôt cités précédemment. L'aspect visuel, les épaisseurs et l'homogénéité des dépôts ont été étudiés par une caractérisation optique et mécanique qui a soulevé l'importance du traitement de surface. L'observation microscopique de la surface des polymères à empreintes moléculaires obtenues dans ces conditions, a révélé la présence d'une structure poreuse avec des sections de pores de dimensions différentes dans les couches minces de MIP.

Les caractérisations électriques des dispositifs à ondes de Love équipés de ces couches minces de MIP-DMSO, ont été effectuées au moyen d'un analyseur de réseau. Ces résultats de caractérisation présentent des niveaux de pertes compatibles avec notre application, et valident ainsi la faisabilité et l'efficacité du couplage entre les dispositifs à ondes acoustiques et les polymères à empreintes moléculaires. Par conséquent nous avons pu procéder par la suite au test d'autres polymères à empreintes moléculaires en utilisant ce même protocole.

Deux polymères visant à détecter le nucléoside pseudouridine à base de deux monomères fonctionnels HALL et BAAPY ont ainsi été développés à partir d'un protocole en forme volumique. La caractérisation par microscopie électronique à balayage a révélé la présence de

macropores dans le polymère qui contrairement au MIP/AMP ne présente pas de problème de séparation de phase du solvant. Comme le MIP/AMP, la taille et la densité poreuse du film varient en fonction de l'épaisseur. En effet, plus le film est épais, plus il présente des pores de taille et de densité importantes. Un autre polymère en couche mince pour la détection de 8-OhdG a été développé. Les caractérisations électriques des capteurs associés des polymères (MIP/AMP, MIP/pseudouridine à base de HALL et BAAPY et le MIP/8OHdG), ont démontré la compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique. Ces résultats de caractérisation électriques présentent des niveaux de pertes compatibles avec notre application de détection en régime statique et partiellement en régime hydrodynamique qui fera l'objet du chapitre suivant.

V. Détection d'analogues de nucléosides en milieu liquide

V.1. Introduction

Ce chapitre est consacré aux résultats de détection d'analogues de nucléosides. Dans un premier temps, nous avons réalisé des tests en régime statique. Dans ce cas de figure les capteurs subissent différents traitement d'extraction de l'empreinte et de recapture de la molécule cible. Les dispositifs sont caractérisés électriquement après chaque étape afin d'évaluer l'effet de l'impression sur la réponse fréquentielle.

Ces tests seront par la suite appliqués aux polymères à empreintes moléculaires à base de pseudouridine et 8OHdG adaptés en couches minces et décrits dans le chapitre précédent.

La seconde partie du chapitre est consacrée à nos travaux axés sur la détection d'analogues de nucléosides en temps réel. Pour ces tests, nous avons utilisé la configuration détaillée dans le chapitre III, où le capteur/MIP est associé au système micro fluide et inséré dans un dispositif de conditionnement électronique afin d'enregistrer les variations de fréquence en temps réel. Ces tests de détection sont appliqués à l'adénosine monophosphate pour évaluer la sensibilité de l'ensemble capteur à onde Love/MIP. La sélectivité envers des molécules proches de l'AMP sera également étudiée en utilisant cette configuration.

V.2. Détection d'analogue de nucléosides en régime statique

Les résultats présentés en suivant ont été obtenus en utilisant la configuration du chapitre III où le capteur est inséré dans une cellule de test. Celle-ci est branchée à l'analyseur de réseau pour mesurer la fréquence d'oscillation du capteur et les pertes d'insertion associées (cf. partie 2.3 Caractérisation électrique des capteurs à ondes de Love). Cette étape de mesure est répétée pour chacune des étapes suivantes :

1. Avant dépôt du MIP
2. Après dépôt du MIP/AMP
3. Après extraction de l'empreinte AMP
4. Après recapture de l'AMP

Les courbes de mesures sont ainsi enregistrées et superposées pour évaluer l'effet de l'extraction et de la recapture de la molécule empreinte.

V.2.1. Détection d'adénosine mono phosphate en régime statique

V.2.1.1. Extraction des empreintes

Cette étape consiste à briser les liaisons non covalentes entre la molécule cible et le complexe polymérisé afin de créer des sites de reconnaissance complémentaires à l'AMP (cette étape ne concerne que le protocole de préparation des MIPs). La solution d'extraction est un mélange d'ammoniaque 100 mM et de méthanol (70/30 v/v)).

- Mettre 6.25 ml d'ammoniaque (ammonium hydroxide) et 63.75 ml de H₂O pure (eau doublement distillée) et ajouter 30 ml de méthanol (MeOH).
- Plonger les substrats dans cette solution pendant toute une nuit dans le réfrigérateur à 4°C.
- Rincer abondamment avec l'eau (4 fois) et laver au méthanol.

La solution obtenue peut être conservée au réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.

V.2.1.2. Réinsertion de la molécule cible

Durant cette étape, le capteur recouvert d'un film de MIP, ayant subi une extraction, est plongé dans une solution tampon contenant des particules d'AMP (nucléotides). Des liaisons entre celles-ci et les sites de reconnaissance de la couche du MIP se créent alors. Le tampon est une solution (d'acide acétique/hydroxylamine) à 1 mM et au PH 7. Celui-ci est ajusté grâce à un pH-mètre. Cette étape est détaillée en Annexe 2.

V.2.1.3. Caractérisation électrique des capteurs à couches minces MIP-AMP

La caractérisation du MIP vise ici à mettre en évidence par des mesures électriques la formation des empreintes et leur affinité pour la molécule ciblée.

La Figure V. 1 montre ainsi la réponse en transmission S₂₁ en gain et en phase du capteur avant, après dépôt, après extraction des empreintes et après recapture de 145 ppm d'AMP pour un polymère imprimé (MIP-DMSO) d'épaisseur 500 nm. Le minimum de pertes d'insertion apparaît à la fréquence 114,5 MHz. Nous observons sur cette figure un décalage en fréquence de 70 kHz et une augmentation des pertes de 7 dB suite au dépôt du polymère. Nous pouvons ainsi considérer que les capteurs restent ainsi adaptés pour une utilisation

ultérieure en montage oscillateur, dans le cadre d'un fonctionnement en temps réel, suite au dépôt du film de MIP-DMSO d'épaisseur 500 nm.

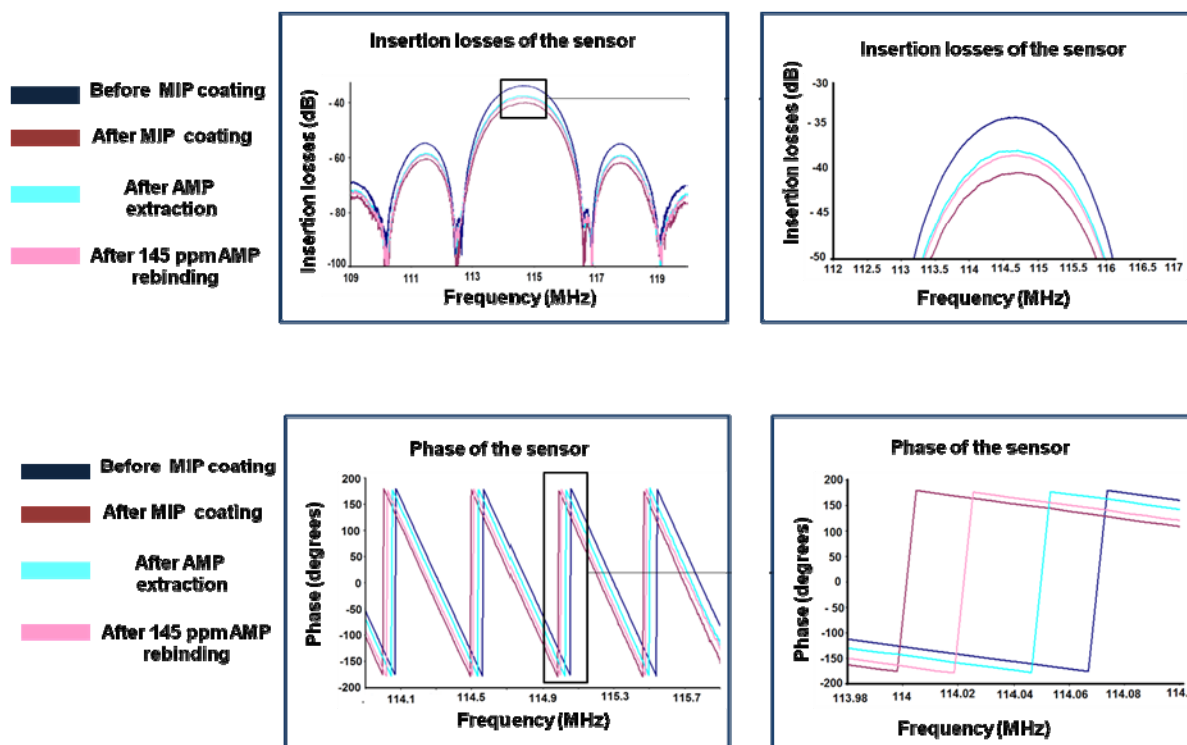


Figure V. 1 Pertes d'insertion et réponse en phase du capteur pour une concentration de 145 ppm d'AMP.

Sur la même figure précédente, on peut voir que la réponse fréquentielle du capteur est cohérente avec le principe du MIP. En effet, lors de l'extraction, la fréquence augmente, allant dans le sens d'une diminution de l'effet de masse. Lors de la recapture, on enregistre une diminution de fréquence, compatible avec une augmentation de masse liée. Ainsi, cette réponse en phase montre que le capteur est sensible à une concentration de 145ppm d'AMP, avec une diminution de fréquence correspondante légèrement supérieure à 20 kHz.

Nous avons procédé à la caractérisation électrique d'une autre ligne à retard et avons enregistré la réponse en termes de fréquence et de pertes d'insertion pour les mêmes étapes citées précédemment (avant dépôt, après dépôt, après extraction et après recapture). De la même manière, les variations en fréquence représentées dans la Figure V. 2 étaient cohérentes avec le principe du MIP. En effet le dépôt génère une diminution de la fréquence de 120 kHz due à l'effet de masse et une augmentation des pertes d'insertion de 17 dB suite au dépôt du polymère. L'extraction de l'AMP entraîne une augmentation de fréquence de 30 kHz due à l'élimination des molécules AMP de la couche sensible. Enfin la recapture de l'AMP se traduit par une variation de fréquence négative due à l'effet de masse induit par la sorption de

l'AMP dans les cavités de reconnaissance du polymère. La couche sensible obtenue a démontré une variation de fréquence de 6 kHz pour une concentration de 25 ppm d'AMP.

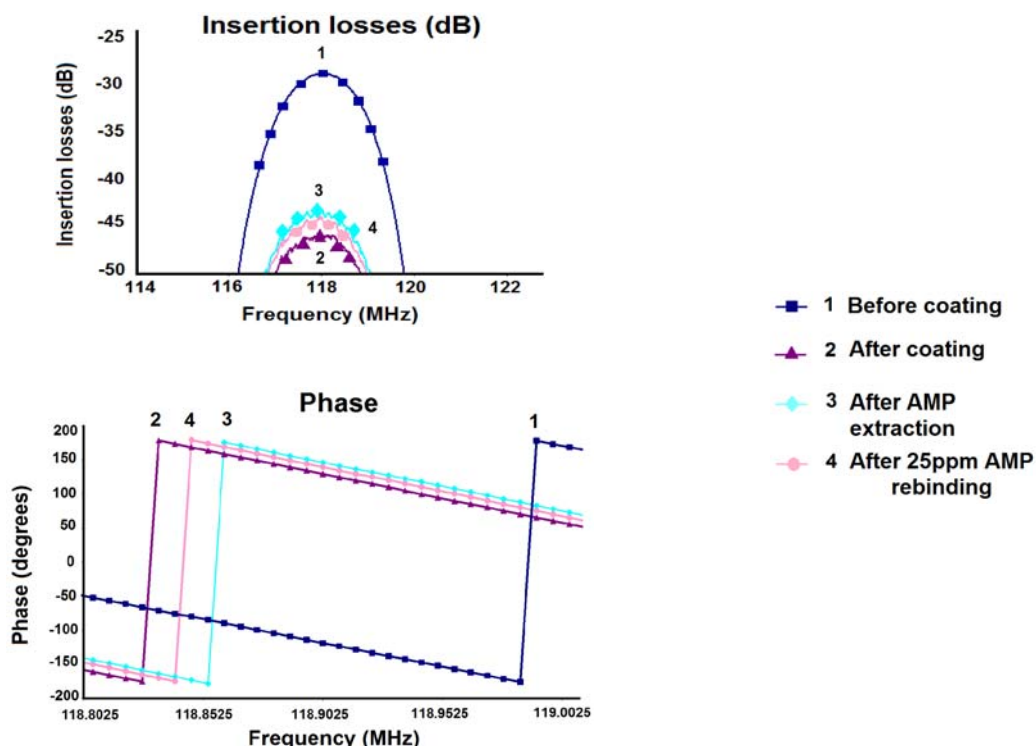


Figure V. 2 Pertes d'insertion et réponse en phase du capteur pour une concentration de 25ppm d'AMP.

Des tests de répétabilité ont été réalisés pour des capteurs soumis aux mêmes conditions expérimentales. La Figure V. 3 montre les variations en fréquence enregistrées suite à des recaptures successives de 25ppm d'AMP après 30min, 1heure et 2heures pour des capteurs ayant la même épaisseur de couche sensible de polymère imprimé (1 μ m). On remarque que les points enregistrés sont proches et ce pour les trois capteurs fonctionnalisés avec les mêmes paramètres de dépôt (vitesse: 2000rpm, accélération : 4000 rpm/s, temps : 10s), conditions de polymérisation (365 nm, lampe UV à 62,3 μ W/cm², flux d'azote), temps d'extraction (trois heures). Ces mesures montrent également l'effet direct du temps d'exposition du capteur à la solution d'AMP sur la variation de fréquence. On remarque que des temps de recapture plus longs entraînent des variations de fréquence plus importantes.

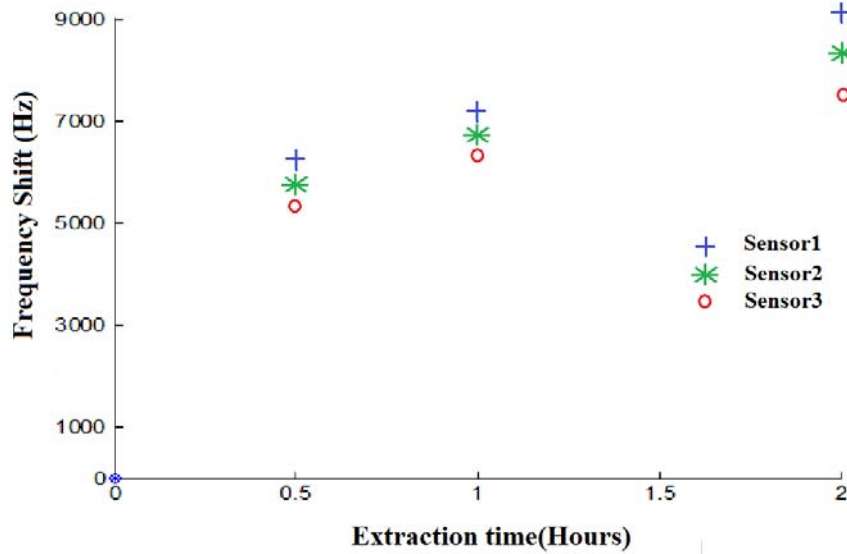


Figure V. 3 Variations en fréquence (en valeur absolue) suite à une série de recaptures successives de 25ppm d'AMP pour trois capteurs ayant subi les mêmes paramètres de dépôt.

La Figure V. 4 représente les variations de fréquence enregistrées suite à une série de recapture de 25ppm d'AMP pour cinq capteurs dont les épaisseurs de couche sensible de polymère imprimé varient de 600nm à 2.6µm. L'effet de l'épaisseur des couches sensibles sur leur capacité de recapture est mis en évidence. En effet, plus l'épaisseur de la couche polymère est importante plus sa capacité de recapture augmente ce qui se traduit par une plus grande variation en fréquence. Ainsi une couche sensible de polymère plus épaisse contient plus de particules d'AMP conduisant alors à un plus grand nombre de sites de reconnaissance.

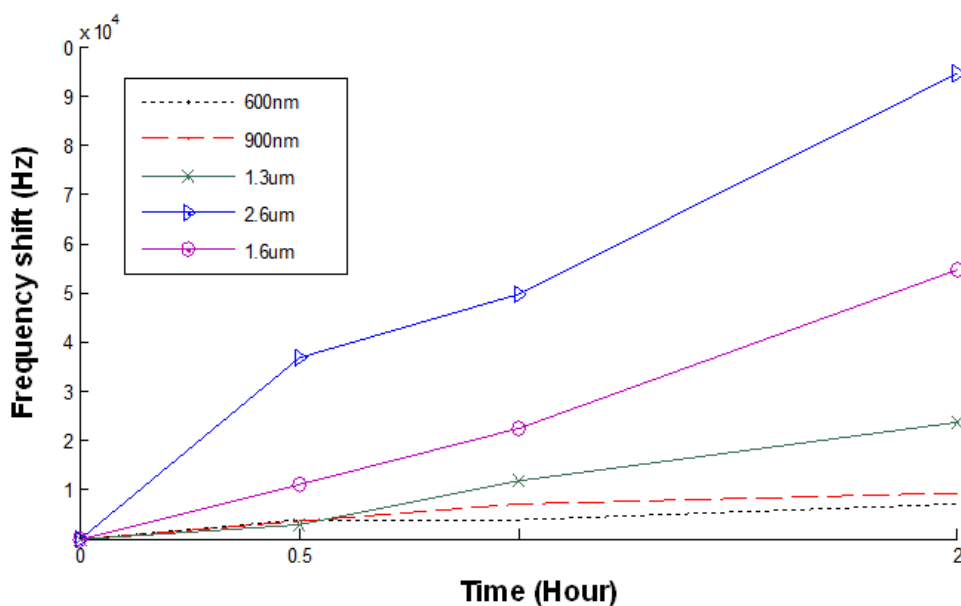


Figure V. 4 Variations en fréquence (en valeur absolue) suite à une série de recapture de 25ppm d'AMP pour des capteurs avec différentes épaisseurs de couche sensible de polymère imprimé.

Sur la Figure V. 5, la comparaison de deux capteurs ayant la même épaisseur de polymère imprimé (mêmes paramètres de dépôt et conditions de polymérisation) démontre l'effet du temps d'extraction sur la capacité de recapture de la couche polymère. Les variations en fréquence enregistrées pour le capteur 2 sont plus importantes que celles du capteur 1 sachant que le capteur 2 a subi un temps d'extraction de 24h tandis que l'extraction pour le capteur 1 a duré 3 heures même si celui-ci a été immergé dans une solution de 25ppm contre une solution de 6ppm d'AMP pour le capteur 2. On pourrait conclure qu'un temps d'extraction plus long entraîne une plus grande capacité de recapture qui se traduit par une variation de fréquence plus importante.

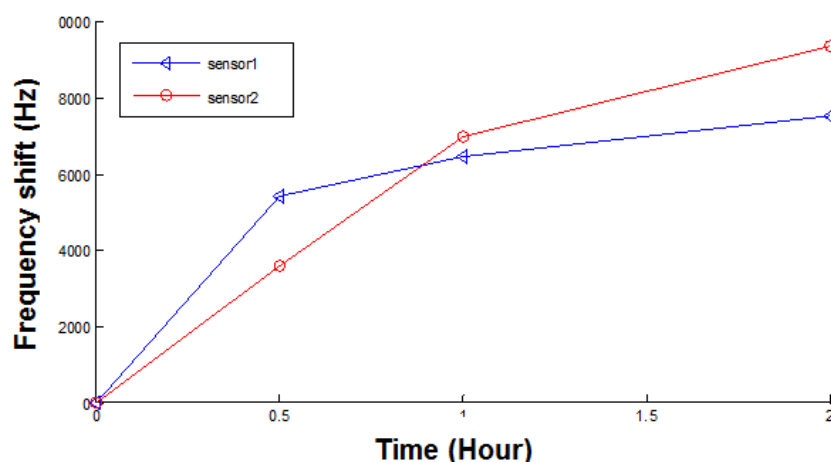


Figure V. 5 Variations en fréquence (en valeur absolue) suite à une série de recapture de 25ppm d'AMP pour deux capteurs ayant subi des temps d'extraction différents.

Les tests préliminaires de détection d'AMP ont ainsi montré la faisabilité du capteur à onde de Love associé aux polymères à empreintes moléculaires. Par la suite, le même protocole a été mis en œuvre pour le test d'autres polymères à empreintes moléculaires visant à détecter d'autres molécules comme la pseudouridine et la 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG).

V.2.2. Détection de pseudouridine en régime statique

V.2.2.1. Extraction des empreintes

Comme nous l'avons abordé dans le chapitre précédent, deux polymères ont été préparés en couches minces à la surface de capteurs acoustiques à onde de Love : d'une part, le MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel BAAPy et d'autre part, le MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel HALL.

Afin d'extraire les molécules empreintes de ces couches minces, les capteurs subissent un premier lavage avec une solution d'eau DI suivi d'un deuxième lavage à l'acétonitrile. Ils sont ensuite immergés dans une solution d'élution de (méthanol 10% / acide formique). Ces étapes durent une heure chacune.

V.2.2.2. Réinsertion des empreintes de pseudouridine :

Les capteurs avec des dépôts de MIP/BAAPY et MIP/ HALL ayant subi l'étape d'extraction précédente sont plongés dans les solutions de conditionnement qui sont le méthanol et l'eau DI (18 MΩ, pH 6.5). Ils sont exposés par la suite à une solution d'eau DI contenant différentes concentrations de pseudouridine.

V.2.2.3. Caractérisation électrique des couches minces du MIP-pseudouridine

Dans ce qui suit, des tests de détection de pseudouridine en régime statique sont réalisés avec ces deux différents polymères.

- *MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel BAAPy*

Afin de vérifier l'effet de l'impression moléculaire sur la réponse du capteur, nous avons procédé aux caractérisations électriques après dépôt, après extraction et après recapture de la molécule empreinte. Nous avons ainsi comparé les paramètres S et tracé les courbes des pertes d'insertion en fonction de la fréquence pour chacune de ces étapes.

Les figures 6 à 8 représentent les réponses en phase des capteurs pour une concentration de 5ppm de Pseudouridine et les pertes d'insertion associées, pour des couches de différentes épaisseurs. Le Tableau V. 1, correspondants aux figures 6 à 8, résume les variations de fréquence et de gain enregistrées suite à l'extraction de l'empreinte et la recapture de 5 ppm de pseudouridine pour trois lignes à retard. De nouveau, les variations de fréquence sont évaluées sur les courbes de phase, à point équiphase. Ces tests ont mis en évidence la cohérence des variations de fréquence avec le principe du MIP/Pseudouridine à base du monomère fonctionnel BAAPY comme pour le MIP/AMP. Lors de l'extraction, la fréquence augmente, allant dans le sens d'une diminution de l'effet de masse. Lors de la recapture, on enregistre une diminution de fréquence, compatible avec une augmentation de masse liée. Ainsi, cette réponse en phase montre que le capteur est sensible à une concentration de 5ppm de pseudouridine, avec une diminution de fréquence correspondante proche de 10 kHz pour le capteur R1H.

Par ailleurs, nous avons observé l'effet de l'épaisseur des couches sensibles sur leur capacité de recapture. Les diminutions de fréquence mesurées suite à la recapture de 5 ppm d'AMP sont ainsi respectivement (10 kHz, 5 kHz et 2.5 kHz) pour les couches de (1 μm , 650 nm et 400 nm). Ainsi, plus l'épaisseur de la couche polymère est importante plus sa capacité de recapture augmente ce qui se traduit par une plus grande variation en fréquence. En effet, une couche sensible de polymère plus épaisse contient de manière logique, un plus grand nombre de sites de reconnaissance.

Tableau V. 1 Les variations de fréquence et de gain enregistrées suite à l'extraction et la recapture dans une solution de 5 ppm de pseudouridine pour les capteurs R1H, R13B et R13H.

Capteur	Epaisseur	Extraction de la Pseudouridine		Recapture dans Pseudouridine (5ppm)	
		Δf (Hz)	Δgain (dB)	Δf (Hz)	Δgain (dB)
R1H	1 μm	37500	3	10000	/
R13B	650 nm	15000	3	5000	1
R13H	400 nm	65000	3	2500	/

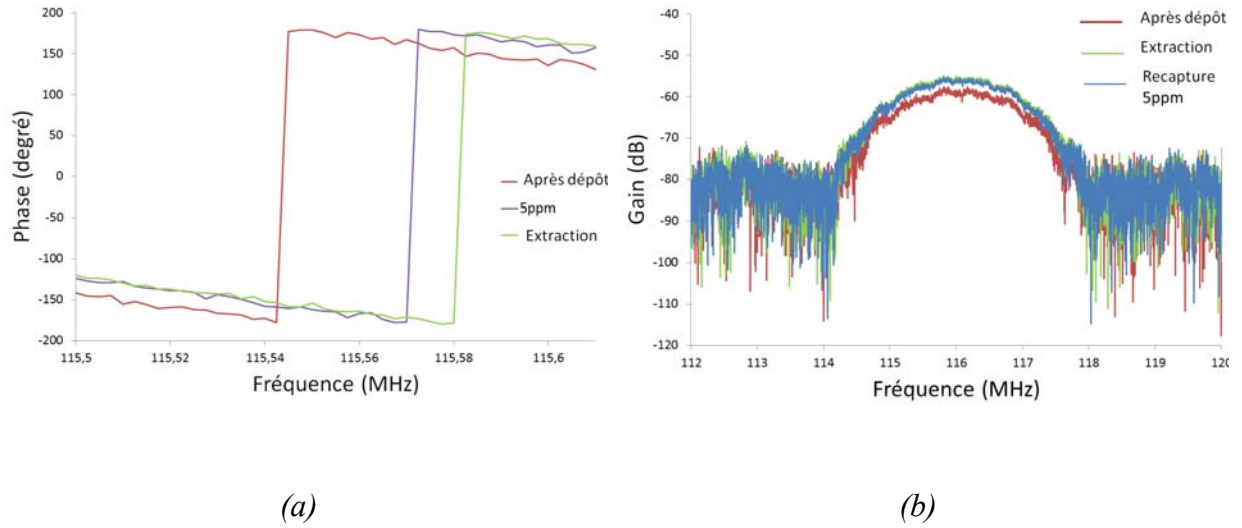
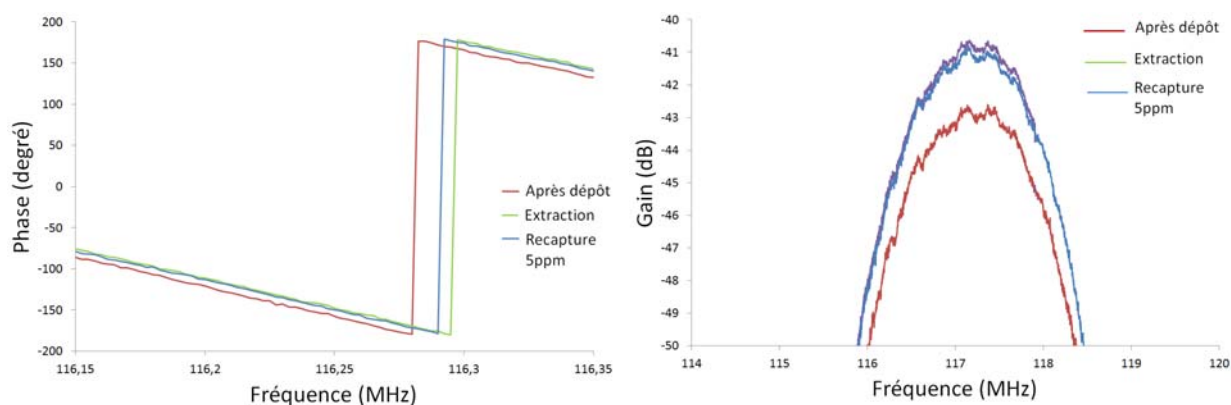


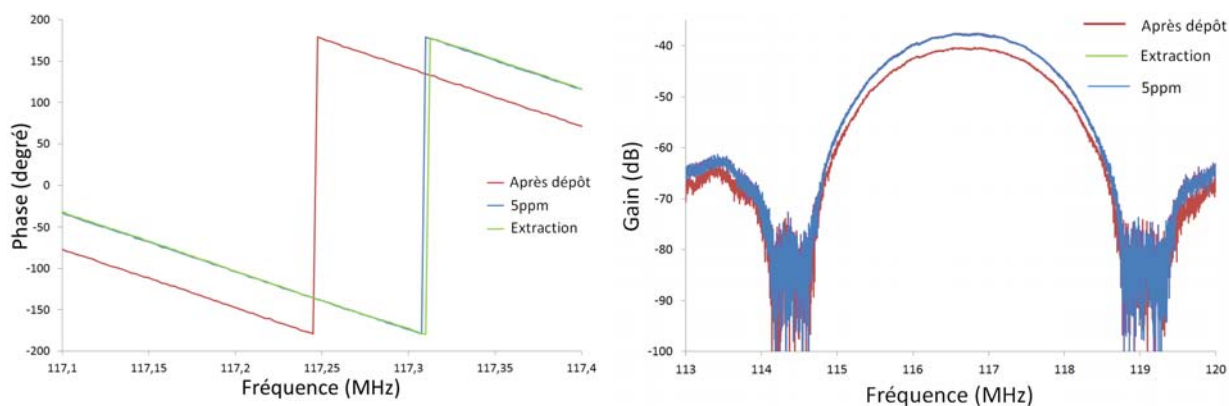
Figure V. 6 (a) Réponse en phase du capteur R1B pour une recapture d'une solution de pseudouridine de 5ppm. (b) Pertes d'insertion associées au même capteur



(a)

(b)

Figure V. 7 (a) Réponse en phase du capteur R13B pour une recapture d'une solution de pseudouridine de 5ppm. (b) Pertes d'insertion associées au même capteur



(a)

(b)

Figure V. 8 (a) Réponse en phase du capteur R13H pour une recapture d'une solution de pseudouridine de 5ppm. (b) Pertes d'insertion associées au même capteur

- **MIP/pseudouridine à base du monomère fonctionnel HALL**

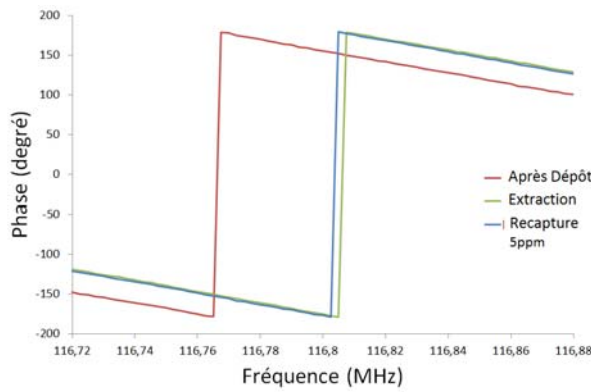
Comme pour le polymère précédent, nous avons ainsi comparé les paramètres S et tracé les courbes des pertes d'insertion en fonction de la fréquence pour chacune des étapes (après dépôt, après extraction et après recapture).

Les figures 9 à 11 représentent les réponses en phase des capteurs pour une concentration de 5ppm de Pseudouridine et les pertes d'insertion associées. Le Tableau V. 2 correspondant aux figures 10 à 11, résume les variations de fréquence et de gain enregistrées suite à l'extraction de l'empreinte et la recapture dans une solution de 5 ppm de pseudouridine. La même cohérence a été observée, avec une augmentation de fréquence lors de l'extraction et une

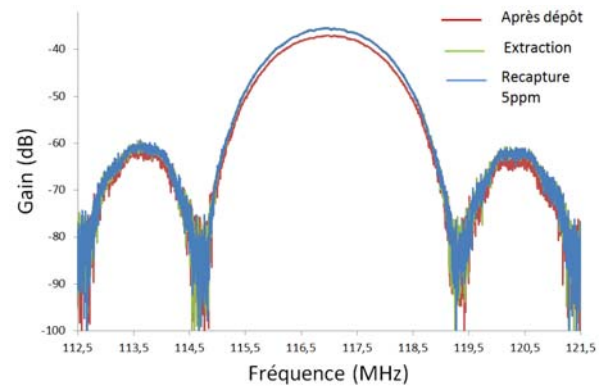
diminution de fréquence lors de la recapture, compatible avec une augmentation de masse liée. Ainsi, cette réponse en phase montre que le capteur est sensible à une concentration de 5ppm de pseudouridine, avec une diminution de fréquence correspondante de 5 kHz pour le capteur R20D9H.

Tableau V. 2 Les variations de fréquence et de gain enregistrées suite à l'extraction et la recapture d'une solution de pseudouridine d'une concentration de 5ppm pour les lignes à retard R20D8H, R20D9H et R31A11H.

Capteur	Epaisseur	Extraction de la Pseudouridine		Recapture de Pseudouridine (5ppm)	
		Δf (Hz)	Δgain (dB)	Δf (Hz)	Δgain (dB)
R20D8H	400 nm	40000	2	2500	/
R20D9H	400 nm	90000	2	5000	/
R31A11H	400 nm	22500	4	5000	/



(a)



(b)

Figure V. 9 (a) Réponse en phase du capteur R20D8H suite à une recapture d'une solution de pseudouridine d'une concentration de 5ppm, (b) Pertes d'insertion associées au même capteur

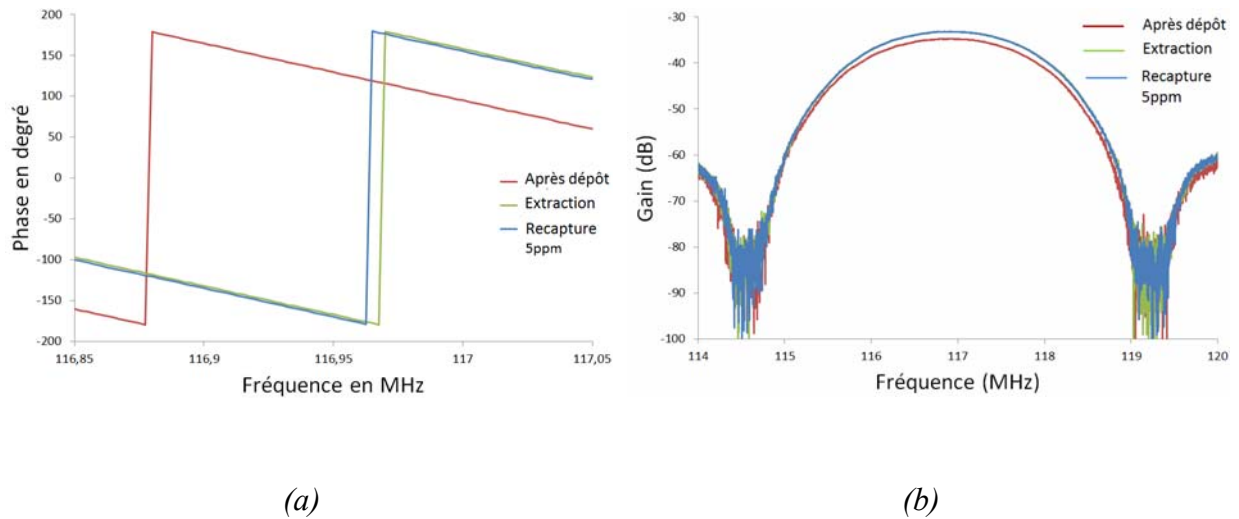


Figure V. 10 (a) Réponse en phase du capteur R20D9H suite à une recapture d'une solution de pseudouridine d'une concentration de 5ppm, (b) Pertes d'insertion associées au même capteur

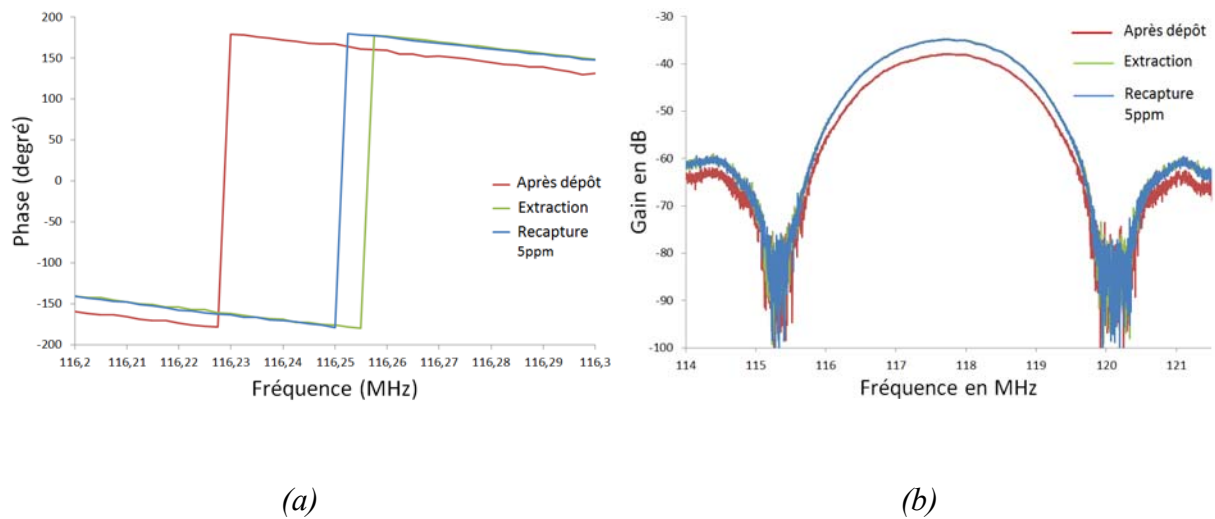


Figure V. 11 (a) Réponse en phase du capteur R31A11H suite à une recapture d'une solution de pseudouridine d'une concentration de 5ppm, (b) Pertes d'insertion associées au même capteur.

Outre la sensibilité du capteur acoustique associé au MIP à base du monomère BAAPY et du monomère HALL envers la molécule pseudouridine, en comparant ces deux polymères, les mesures ont démontré la sensibilité élevée du MIP/HALL par rapport au MIP BAAPY lors de la recapture dans une solution d'une concentration de 5ppm de pseudouridine. En effet, pour des capteurs soumis aux mêmes conditions expérimentales donnant lieu à des moyennes d'épaisseur identiques (400 nm), les variations de fréquence suite à la recapture étaient de 5 k

Hz pour le MIP/HALL contre 2.5 k Hz pour le MIP/BAAPY. Ceci conforte les résultats obtenus par HPLC qui ont démontré la grande capacité de recapture du MIP/HALL.

V.2.3. Détection de 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OHdG)

V.2.3.1. Extraction des empreintes

Afin d'extraire la molécule empreinte Guanosine des dépôts de MIP, les substrats capteurs recouverts de dépôts de MIP ont été immergés respectivement dans les trois solutions suivantes pendant 1 heure (cf. Figure V. 12):

- Méthanol,
- Méthanol-acide acétique (9 :1, v/v)
- Méthanol-solution aqueuse d'acide acétique à 0.1% (2 :8, v/v)

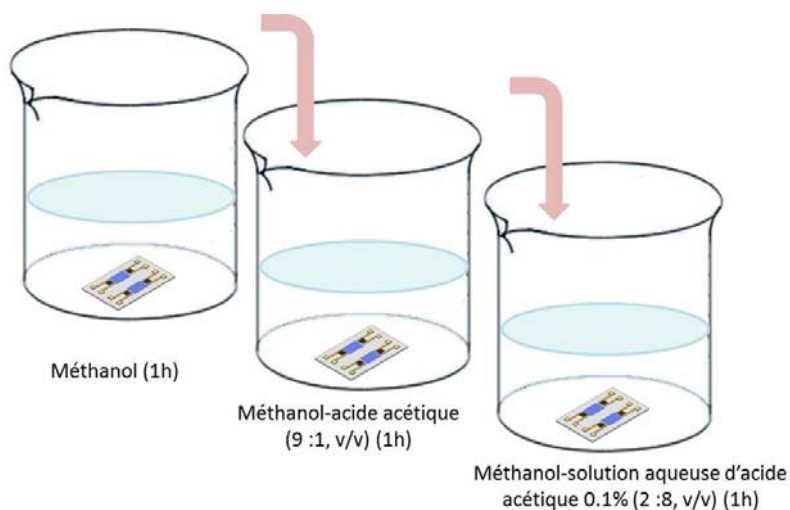


Figure V. 12 Représentation du protocole d'extraction des empreintes guanosine des couches de MIP

V.2.3.2. Réinsertion de la molécule cible

Pour réaliser les tests de recapture de molécule 8-OHdG, une solution de Méthanol avec une concentration de (100 ppm) du biomarqueur 8-OHdG a été préparée. A partir de cette solution stock, des solutions de concentrations différentes ont été réalisées avec le solvant acétonitrile. On atteint ainsi la concentration désirée de 8-OHdG en diluant la solution stock dans l'acétonitrile. Les capteurs ayant subi au préalable une extraction des empreintes guanosine sont ainsi plongés dans ces solutions pendant 1 heure.

Pour réutiliser les capteurs, nous avons par la suite procédé à l'extraction des molécules 8-OHdG en plongeant les capteurs (qui ont subi une recapture 8-OHdG) dans une solution d'acétonitrile. Celui-ci a été choisi comme solvant en raison de sa forte capacité d'extraction des marqueurs 8-OHdG par rapport à d'autres solvants.

V.2.3.3. Caractérisation électrique des couches minces du MIP- 8-hydroxy-2'deoxyguanosine

Afin d'étudier l'influence des dépôts de couche mince de MIP/guanosine, placés sur le chemin sensible du capteur à onde acoustique, celui-ci est inséré dans la cellule de test et les paramètres S des capteurs sont mesurés à l'analyseur de réseau pour chacune des étapes suivantes :

- Avant dépôt du MIP
- Après dépôt du MIP/guanosine
- Après extraction de la guanosine
- Après recapture de 100 ppm de 8-OHdG
- Après un premier lavage à l'acétonitrile
- Après une première élution à l'acide acétique/Méthanol
- Après recapture de 10 ppm 8-OHdG
- Après un second lavage à l'acétonitrile
- Après une seconde élution à l'acide acétique/Méthanol

Les fréquences correspondantes au minimum de pertes d'insertion sont représentées dans la Figure V. 13.

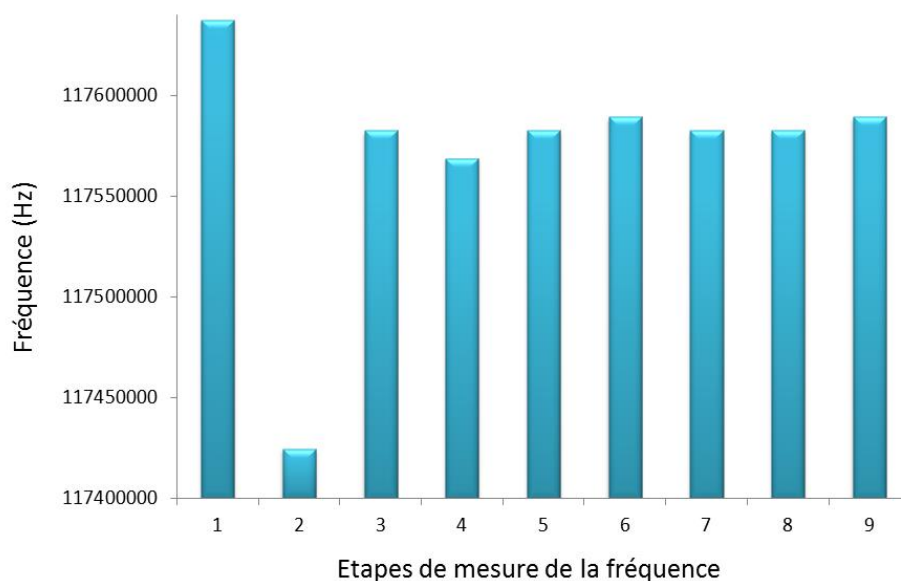


Figure V. 13 Fréquences mesurées du capteur acoustique à onde de Love (R5H) correspondantes au minimum des pertes d'insertion en gain pour chacune des étapes suivantes : 1) Avant dépôt du MIP, 2) Après dépôt du MIP/guanosine, 3) Après extraction de la guanosine, 4) Après recapture de 100 ppm de 8-OHdG, 5) Après un premier lavage à l'acétonitrile, 6) Après une première élution à l'acide acétique/Méthanol, 7) Après recapture de 10 ppm 8-OHdG, 8) Après un second lavage à l'acétonitrile, 9) Après une seconde élution à l'acide acétique/Méthanol.

L'étape 1 consiste à mesurer la fréquence correspondant au minimum des pertes d'insertion pour le capteur nu. Une fois le MIP/guanosine déposé à la surface du capteur une variation de fréquence négative de l'ordre de 213 kHz est enregistrée (étape 2). Les molécules empreintes de guanosine sont extraites du polymère à l'étape 3 libérant ainsi les cavités de reconnaissance et ceci se traduit par une variation de fréquence positive de l'ordre de 158 kHz. L'étape 4 de recapture consiste à exposer la couche polymère à une solution de molécules de 8-OHdG d'une concentration de 100 ppm. Celles-ci viennent se positionner dans les pores imprimés par la guanosine et engendrent une variation de fréquence négative de 13.75 kHz. Le capteur subit alors un premier lavage dans l'étape 5, pendant lequel l'acétonitrile élimine toutes les interactions non spécifiques donnant lieu à une variation de fréquence positive estimée à 13.75 kHz. L'étape 6 d'élution avec la solution d'acide acétique/Méthanol entraîne également une légère variation de fréquence positive de 6 kHz. Après les étapes d'extraction 5 et 6, le capteur est à nouveau exposé à une solution de 8-OHdG de 10 ppm, une variation de fréquence négative de 6 kHz est alors enregistrée suite à la sorption de ces molécules par le film polymère durant l'étape 7. L'extraction des molécules 8-OHdG est réalisée par les lavages consécutifs à l'acétonitrile (étape 8) et à la solution d'acide

acétique/Méthanol (étape 9) qui engendrent respectivement des variations de fréquence positives de 300 Hz et 6.5 kHz.

Les mêmes mesures ont été appliquées à la ligne du bas du capteur R5 (R5B), les résultats sont représentés dans la Figure V. 14. Nous avons constaté des variations de fréquence négatives pour la recapture de 100 ppm et 10 ppm de 8-OHdG de l'ordre de 27.5 kHz et 6 kHz respectivement. Celles-ci sont dues aux molécules de 8-OHdG qui viennent occuper les sites de reconnaissance du MIP ayant subi une extraction. Ces mesures électriques, mettent clairement en évidence comme pour la ligne précédente les effets distincts du lavage et de l'élution. En effet, après l'exposition du capteur à une concentration de 100ppm de 8-OHdG, le lavage à l'acétonitrile (étape 5) élimine toutes les interactions non spécifiques à la surface du polymère. L'élution à la solution d'acide acétique/Méthanol rompt les liaisons spécifiques à la surface du MIP (étape 6) et la fréquence remonte à la même valeur de l'étape d'extraction. Deux autres lignes à retard ont subi les mêmes mesures suite à ces étapes et les résultats ci-dessus ont été vérifiés.

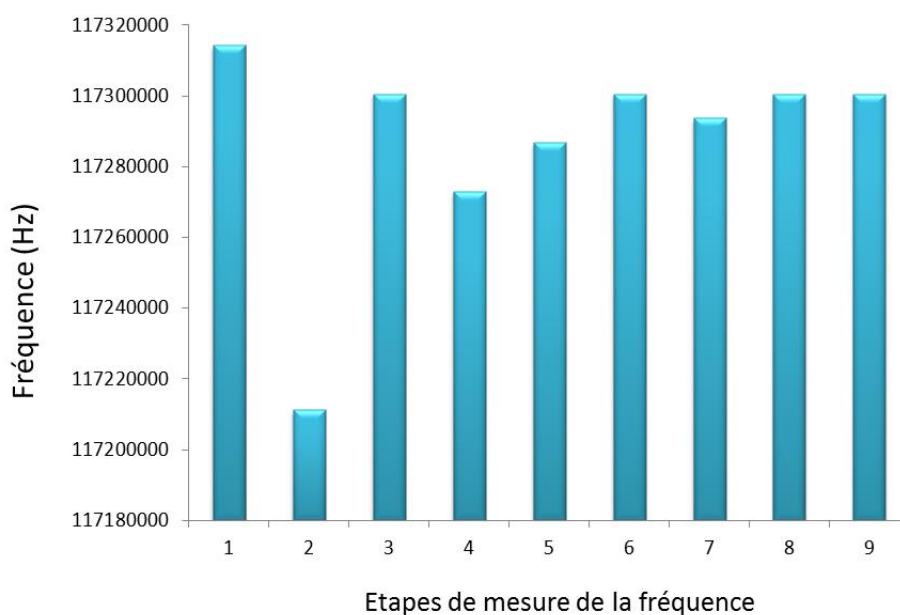


Figure V. 14 Fréquences mesurées du capteur acoustique à onde de Love (R5B) correspondant au minimum des pertes d'insertion pour chacune des étapes suivantes : 1) Avant dépôt du MIP, 2) Après dépôt du MIP/guanosine, 3) Après extraction de la guanosine, 4) Après recapture de 100 ppm de 8-OHdG, 5) Après un premier lavage à l'acétonitrile, 6) Après une première élution à l'acide acétique/Méthanol, 7) Après recapture de 10 ppm 8-OHdG, 8) Après un second lavage à l'acétonitrile, 9) Après une seconde élution à l'acide acétique/Méthanol.

V.3. Détection d'analogue de nucléosides en régime hydrodynamique (temps réel)

V.3.1. Détection d'adénosine mono phosphate en régime hydrodynamique

Dans cette configuration, le capteur acoustique à ondes de Love recouvert d'une couche sensible de polymère imprimé (après extraction) est associé à une puce microfluidique en PDMS et inséré dans une boucle d'oscillation d'un système électronique de conditionnement développé au sein de l'équipe afin de suivre en temps réel l'évolution de la fréquence, image de la vitesse de l'onde. Pour une description détaillée du banc de mesure expérimental utilisé, se référer au chapitre 3. La réponse du capteur pour différentes concentrations d'AMP a ainsi été enregistrée en temps réel.

Dans cette configuration, la chambre microfluidique est maintenue par pression sur le capteur. Le liquide circule sur le chemin de propagation de l'onde alors que les transducteurs sont isolés du liquide grâce à des chambres contenant de l'air. La réponse d'un capteur en temps réel à la recapture d'AMP liée à la modification de la vitesse de phase de l'onde est représentée sur la Figure V. 15. Les réponses d'un même capteur à plusieurs concentrations sont superposées, entre chacune le capteur est démonté et subit une étape d'élution et de rinçage comme indiqué en paragraphe 2.1. La réponse apparaît rapidement après l'injection, typiquement environ 1 minute après, qui correspond principalement au parcours dans les tuyaux en amont du capteur avec une inflexion initiale adoucie par la diffusion entre les fronts des échantillons de référence et de mesure le long de ce parcours. Après une dizaine de minutes, une stabilisation est atteinte, avec une diminution de fréquence en régime permanent qui augmente avec la concentration, de 5 à 600 ppm. Une concentration de 5 ppm d'AMP se traduit ainsi par une diminution de fréquence très visible de l'ordre de 150 Hz.

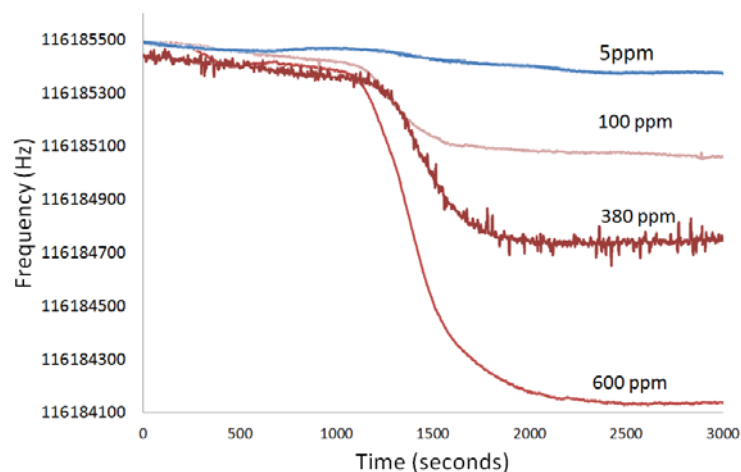


Figure V. 15 Variation de fréquence en temps réel pour différentes concentrations d'AMP

Une autre expérience a été réalisée sur la base de la configuration en temps réel. Nous avons alterné des injections de solution d'AMP d'une concentration de 300 ppm avec celles de solution tampon. Les résultats de ces mesures sont représentés sur la Figure V. 16. Nous pouvons voir que suite à cinq injections de la solution AMP (d'une durée de 10 min, 10 min, 15 min, 15 min et 20 min), plus aucune variation de fréquence n'est enregistrée car la couche de polymère imprimée est saturée. Ceci est dû au fait que les molécules d'AMP qui circulent à la surface du capteur occupent tous les sites de reconnaissance du polymère à empreintes moléculaires.

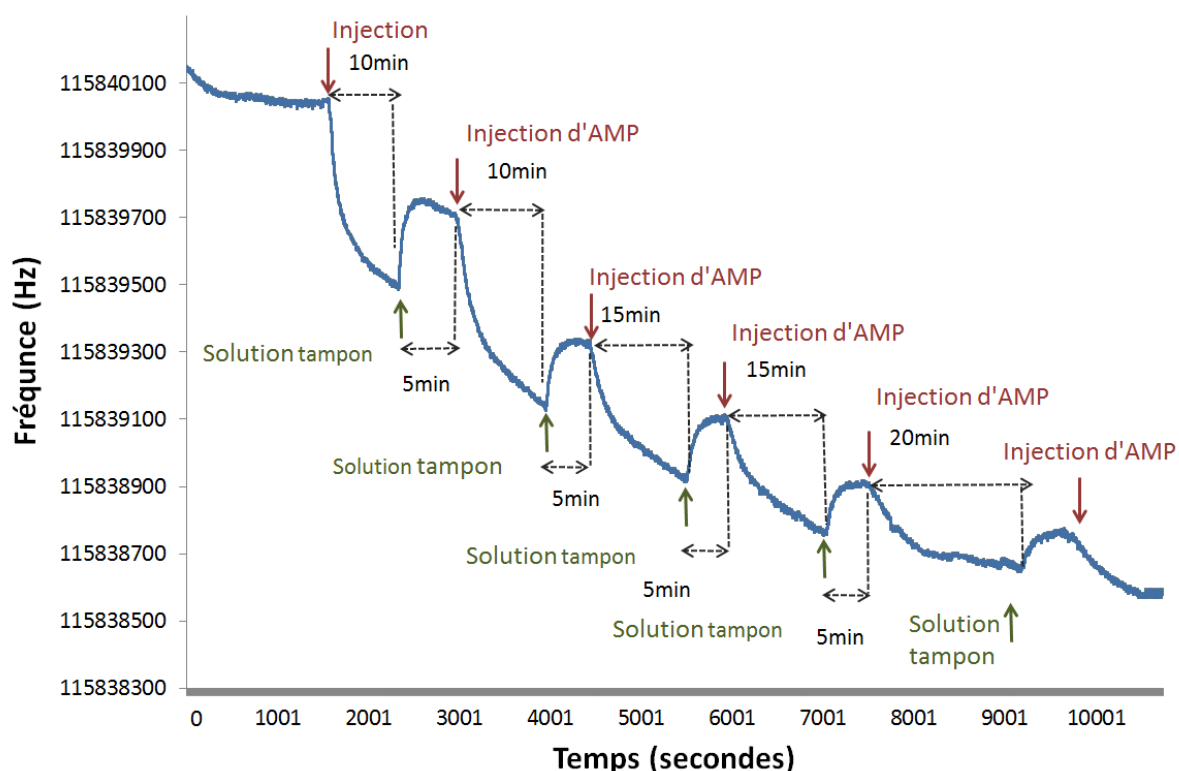


Figure V. 16 Recaptures successives d'une solution d'AMP à une concentration de 300 ppm jusqu'à saturation.

Afin de vérifier la répétabilité des mesures, des capteurs ont été recouverts de couches minces de MIP/AMP suivant les mêmes conditions de dépôt du chapitre IV. Ils ont subi par la suite une étape d'extraction de la molécule empreinte. Ces capteurs ont été disposés dans la cellule de test, elle-même était insérée dans la boucle d'oscillation pour enregistrer les variations de fréquence en temps réel. Les deux capteurs ont été exposés à des solutions de 300 ppm d'AMP alternées avec des passages de la solution tampon. La Figure V. 17 représente la variation de fréquence totale en fonction du temps de passage cumulé d'AMP pour ces deux lignes à retard. Les deux courbes présentent une allure similaire avec une variation totale d'environ 1,6 kHz. Ces tests ont ainsi démontré la répétabilité des mesures d'AMP en temps réel lorsque les capteurs subissent des traitements (temps d'extraction et de recapture) et des protocoles de dépôt, et des conditions expérimentales (débit des solutions injectées) identiques.

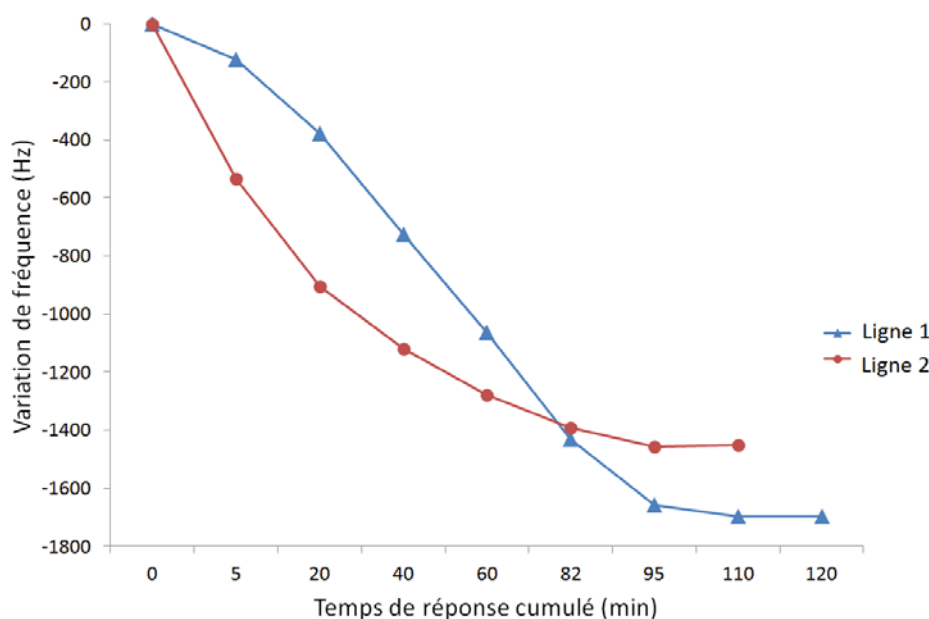


Figure V. 17 Variation de fréquence totale en fonction du temps de passage cumulé d'AMP (300 ppm) pour deux lignes à retard soumises aux mêmes conditions de dépôt.

V.3.2. Tests de sélectivité

La sélectivité du polymère à empreinte moléculaire à base d'adénosine monophosphate avait été évaluée dans le cadre de travaux antérieurs (R. Delépée *et al.* 2010). Ces travaux concernaient le MIP dans sa forme volumique. Dans la suite de nos travaux nous avons souhaité évaluer la sélectivité des couches minces du MIP associées au capteur. Pour cela, nous avons sélectionné trois molécules commerciales semblables à l'adénosine monophosphate à savoir : le 2-phosphonomethoxypropyladenine (PMPA), la cytidine-5'-monophosphate (CMP) et l'adénosine-3'-monophosphate (3'AMP). Les structures chimiques de ces nucléotides sont représentées dans la Figure V. 18.

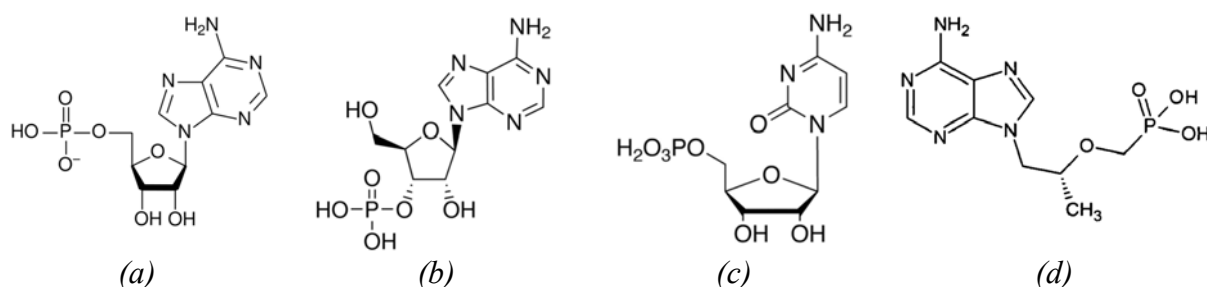


Figure V. 18 Nucléotides utilisés pour les tests de recapture en temps réel: (a) adenosine-5'-monophosphate, (b) adenosine-3'-monophosphate (c) cytidine-5'-monophosphate, (d) 2-phosphonomethoxypropyladenine.

Un capteur avec un dépôt de MIP-AMP a subi des injections successives de 300 ppm d'AMP alternées avec la solution tampon en utilisant le banc expérimental d'enregistrement des variations de fréquences en temps réel. Le débit d'injection des solutions dans la puce microfluidique était de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Une fois la mesure terminée le capteur est soumis à une étape d'extraction de l'AMP telle que décrite précédemment. Le même test est reproduit avec une solution de PMPA, de 3'AMP et de 5'AMP. Les concentrations de ces solutions est de 300 ppm. La Figure V. 19 représente les variations de fréquence en temps réel suite à des recaptures successives de 300 ppm de PMPA. L'exposition de la couche sensible de MIP-AMP à la solution de PMPA a engendré une variation de fréquence négative de 500 Hz soit une affinité de l'ordre du tiers par rapport à l'AMP. Suite au passage de la solution tampon la fréquence réaugmente d'environ 200 Hz. Traduisant le fait que la solution tampon élimine les molécules de PMPA qui forment des liaisons non spécifiques avec la couche de MIP.

Afin de comparer l'affinité de la couche polymère à base d'AMP envers les différentes molécules cibles : AMP, PMPA, 3'AMP et CMP, nous avons superposé les dynamiques de réponses de la même ligne à retard exposée à des solutions d'une concentration de 300 ppm de ces quatre molécules. Les résultats sont représentés dans la Figure V. 20 (a).

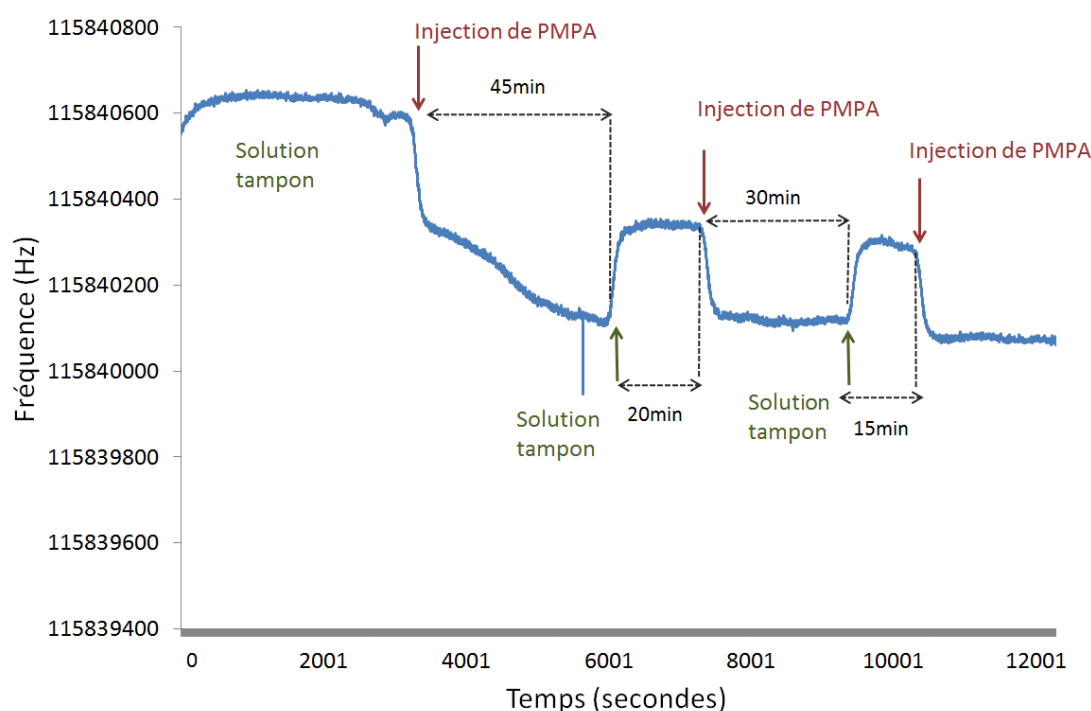


Figure V. 19 Recaptures successives d'une solution de PMPA à une concentration de 300ppm jusqu'à saturation.

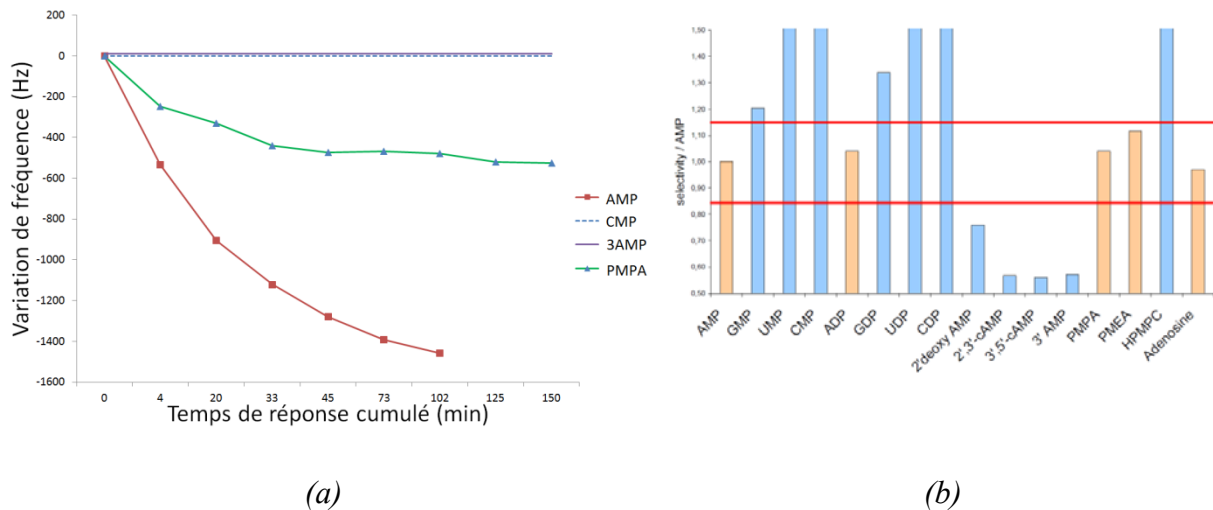


Figure V. 20 (a) Dynamiques de réponses de la même ligne à retard avec MIP-AMP exposée à des solutions d'AMP, de PMPA, de 3'AMP et CMP d'une concentration de 300 ppm, (b) facteurs de sélectivité déterminés pour le MIP-AMP par la méthode HPLC (R. Delépée et al. 2010).

Nous retrouvons sur cette figure que la solution de 300 ppm l'adénosine monophosphate (AMP) à laquelle est exposée la couche mince de MIP déposée à la surface du capteur, entraîne une variation de fréquence proche de 1,5 kHz, supérieure à la variation de fréquence engendrée par la solution de même concentration de PMPA qui est estimée à 500 Hz. Par ailleurs, les molécules de 3'AMP et de 5'AMP n'ont eu aucun effet sur la fréquence de la ligne à retard. Ce qui signifie qu'il n'y a aucune affinité entre ces molécules et la couche sensible de MIP/AMP. Ces résultats confortent ceux obtenus par analyse HPLC dans le cas d'un polymère volumique à base d'AMP comme le montre la Figure V. 20 (b) (R. Delépée et al. 2010).

V.4. Conclusion

Les caractérisations électriques des dispositifs à ondes de Love équipés de couches minces de MIP-AMP, ont été effectuées au moyen d'un analyseur de réseau. Ces résultats de caractérisation présentent des niveaux de pertes compatibles avec notre application, et valident ainsi l'efficacité du couplage entre les dispositifs à ondes acoustiques et les polymères à empreintes moléculaires. De plus, les variations de fréquence enregistrées étaient cohérentes avec le principe d'extraction et de recapture du MIP. Ces tests ont ainsi démontré la faisabilité du couplage de matériau à empreinte moléculaire sur nos capteurs. Par conséquent nous avons pu procéder par la suite au test d'autres polymères à empreintes moléculaires en utilisant ce même protocole.

Deux polymères visant à détecter le nucléoside pseudouridine à base de deux monomères fonctionnels HALL et BAAPY ont ainsi été développés sur le même principe à partir d'un protocole en forme volumique. Les caractérisations électriques des polymères ont démontré la cohérence des variations de fréquence avec le principe du MIP ainsi que l'effet de l'épaisseur de la couche polymère sur sa capacité de recapture. Un autre polymère en couche mince pour la détection de 8-OHdG a été développé. Les caractérisations électriques de ce polymère ont mis en évidence l'effet de l'impression moléculaire et la différence entre les étapes de lavage qui consistent à éliminer les interactions non spécifiques et l'étape d'élution qui permet d'éliminer les liaisons spécifiques. Des sensibilités de 2400 Hz par ppm du nucléotide AMP, 2000 Hz par ppm de pseudouridine et 6kHz par ppm de 8-OHdG ont été atteintes avec cette configuration en statique.

Le protocole de dépôt détaillé en annexe 2 a été retenu pour réaliser des couches minces de 200 à 300 nm compatibles avec un fonctionnement en oscillateur pour la détection d'analogues de nucléosides en temps réel. Des mesures ont été alors réalisées avec différentes concentrations d'AMP. Nous avons ainsi obtenu un seuil de détection expérimental de 5ppm avec cette configuration.

Nous avons, par ailleurs, vérifié les dynamiques de réponse des capteurs. Celles-ci étaient identiques pour des lignes à retard soumises aux mêmes conditions expérimentales et exposées à la même concentration d'AMP (300 ppm pour ces tests).

Des tests de sélectivités ont confirmé les résultats obtenus par analyse HPLC sur le même polymère développé en forme volumique. Le polymère a démontré la plus grande affinité envers la molécule AMP comparé à la molécule PMPA. Sachant que les molécules 3'AMP et 5'AMP n'ont produit aucun effet sur la fréquence et ce, dans les mêmes conditions expérimentales.

Conclusion générale

Ces travaux visaient à développer un capteur à onde de Love à base de polymères à empreinte moléculaire pour la détection de biomarqueurs urinaires du cancer colorectal.

Une étude bibliographique et technique préalable, a abouti au choix d'une technique de dépôt par centrifugation (*spin-coating*), une méthode courante pour produire un film mince et uniforme sur un substrat. Dans un premier temps, il a fallu adapter le protocole de préparation volumique des solutions MIP/AMP et NIP, et trouver les paramètres de dépôt appropriés à savoir, la vitesse l'accélération, le temps et la quantité ainsi que les conditions optimales de polymérisation afin de réaliser des films en couches minces (< 500 nm) localisés sur la zone de propagation d'onde de notre capteur à ondes acoustiques. La polymérisation est réalisée en absence d'oxygène, par une technique d'insolation sous Ultraviolet dans une chambre inerte, sous circulation d'azote pendant toute la durée de la polymérisation. D'autre part, il est apparu nécessaire de trouver un traitement de surface adapté pour que la solution adhère au substrat.

L'aspect visuel, les épaisseurs et l'homogénéité des dépôts ont été étudiés par une caractérisation optique et mécanique qui a soulevé l'importance du traitement de surface. L'observation microscopique de la surface des polymères à empreintes moléculaires obtenues dans ces conditions, a révélé la présence d'une structure poreuse avec des sections de pores de dimensions différentes dans les couches minces de MIP.

Les caractérisations électriques des dispositifs à ondes de Love équipés de ces couches minces de MIP-DMSO, ont été effectuées au moyen d'un analyseur de réseau. Ces résultats de caractérisation présentent des niveaux de pertes compatibles avec notre application, et valident ainsi la faisabilité et l'efficacité du couplage entre les dispositifs à ondes acoustiques et les polymères à empreintes moléculaires. Par conséquent nous avons pu procéder par la suite au test d'autres polymères à empreintes moléculaires en utilisant ce même protocole.

Deux polymères visant à détecter le nucléoside pseudouridine à base de deux monomères fonctionnels HALL et BAAPY ont ainsi été développés à partir d'un protocole en forme volumique. La caractérisation par microscopie électronique à balayage a révélé la présence de macropores dans le polymère qui contrairement au MIP/AMP ne présente pas de problème de séparation de phase du solvant. Comme le MIP/AMP, la taille et la densité poreuse du film varient en fonction de l'épaisseur. En effet, plus le film est épais, plus il présente des pores de taille et de densité importantes. Un autre polymère en couche mince pour la détection de 8-OhdG a été développé. Les caractérisations électriques des capteurs associés des polymères

(MIP/AMP, MIP/pseudouridine à base de HALL et BAAPY et le MIP/8OHdG), ont démontré la compatibilité des dépôts avec la propagation de l'onde acoustique. De plus, les variations de fréquence enregistrées étaient cohérentes avec le principe d'extraction et de recapture du MIP. Ces tests ont ainsi démontré la faisabilité du couplage de matériau à empreinte moléculaire sur nos capteurs. Des sensibilités de 2400 Hz par ppm du nucléotide AMP, 2000 Hz par ppm de pseudouridine et 6kHz par ppm de 8-OHdG ont été atteintes avec cette configuration en statique.

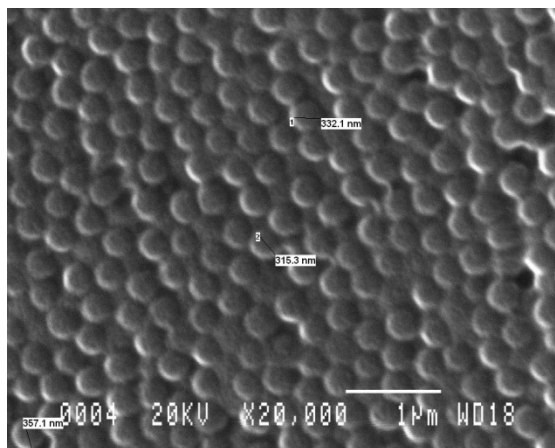
Le protocole de dépôt détaillé en annexe 2 a été retenu pour réaliser des couches minces de 200 à 300 nm compatibles avec un fonctionnement en oscillateur pour la détection d'analogues de nucléosides en temps réel. Des mesures ont été alors réalisées avec différentes concentrations d'AMP. Nous avons ainsi obtenu un seuil de détection expérimental de 5ppm avec cette configuration.

Nous avons, par ailleurs, vérifié les dynamiques de réponse des capteurs. Celles-ci étaient identiques pour des lignes à retard soumises aux mêmes conditions expérimentales et exposées à la même concentration d'AMP (300 ppm pour ces tests).

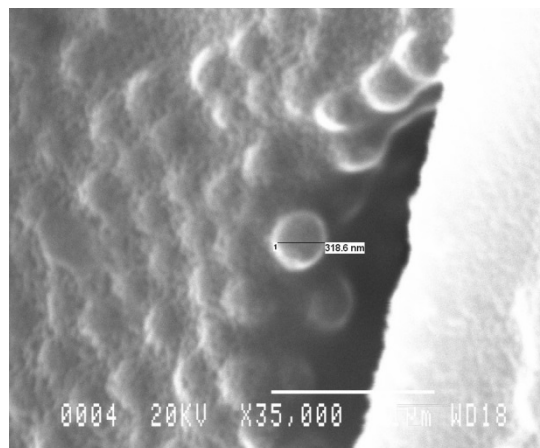
Des tests de sélectivités ont confirmé les résultats obtenus par analyse HPLC sur le même polymère développé en forme volumique. Le polymère a démontré la plus grande affinité envers la molécule AMP comparé à la molécule PMPA. Sachant que les molécules 3'AMP et 5'AMP n'ont produit aucun effet sur la fréquence et ce, dans les mêmes conditions expérimentales.

En perspectives à ces travaux de thèse, des mesures quantitatives des différentes molécules cibles par spectrométrie de masse pourraient être réalisées sur les solutions circulant à la surface des capteurs équipés de couches polymères (avant et après la mesure). Les résultats de ces mesures pourraient alors être étudiés en parallèle avec ceux obtenus par les mesures électriques du capteur acoustique.

Une autre piste envisageable consisterait à synthétiser le polymère imprimé sous forme de nanobilles qui seraient par la suite déposées à la surface du capteur. Cela accroîtrait de manière significative la surface du matériau ce qui conduirait à une augmentation de la sensibilité. Nous avons ainsi réalisé une série de dépôts de nanobilles polymères compatible avec le solvant DMSO (fournies par notre partenaire MERCK) sur des échantillons en silicium. La figure suivante représente les clichés MEB obtenus suite aux dépôts.



(a)



(b)

Figure V. 21 Clichés MEB de nanobilles polymères MERCK déposés à la surface d'échantillons de silicium.

Annexe 1

Protocole Piranha

Manipulation piranha

- Manipulation sous la hotte acide de la salle blanche.
- 2 paires de gants : Nitrile
- Visière et lunettes obligatoire!

Nettoyage Piranha

But: activer la surface Si et création de liaisons OH et élimination des contaminations organiques.

Dans un bécher gradué:

- a) Mettre 1/2 litre de H_2O_2 (30%) (pour son stockage: voir le document Sécurité) ;
- b) Ajouter 1/2 litre de H_2SO_4 (95%) (Idem) ;
- c) Tremper immédiatement les substrats dans la solution chaude active (elle est environ à $110^{\circ}C$) pendant 10min (voire 15min) ;
- d) Pré rinçage + rinçage abondant avec l'eau DI ;
- e) Séchage des plaquettes en verre ;
- f) Récupération de la solution: il faut la laisser refroidir et la mettre dans une bouteille ouverte avec valve sous extraction et ne pas mélanger cette solution avec des acides.

Remarque: En l'absence de centrale de neutralisation pour très petites quantités (150 ml par semaine), la solution récupérée froide est évacuée dans l'évier selon le protocole suivant :

- 1) Ecoulement d'eau pour être sûr que la conduite ne contient pas de solvants (risque d'explosions)
- 2) Evacuation de la solution récupérée dans un bécher rempli d'eau et laisser l'eau couler (5 litres à 10 litres).

Annexe 2

Description des opérations technologiques pour la préparation de la solution MIP à base d'AMP

ETAPE	LIBELLE	OPERATIONS	DETAILS – OBSERVATIONS – APPAREIL
1	Choix du substrat	Capteurs acoustiques à onde de love	Caractéristiques : 24mm x 15mm ep :0.1mm.
2	Nettoyage	<ul style="list-style-type: none"> - Plonger les capteurs dans l'acétone, recouvrir avec du parafilm et laisser toute la nuit. - Mettre les capteurs dans un bain ultrasons d'acétone pendant 10 minutes. - Rincer les capteurs à l'éthanol, Sécher avec un flux d'azote. 	<ul style="list-style-type: none"> - Bain ultrasons (Touzart Matignon 220V) - Frotter mécaniquement si on voit au microscope qu'il y a encore des résidus accrochés à la surface. <p>Remarque : Si le capteur est neuf, un lavage (acétone/ isopropanol/ eau déionisée) est suffisant.</p>
3	Caractérisation électrique	<ul style="list-style-type: none"> - Calibrer l'analyseur de réseau sur la bonne gamme de fréquence de fonctionnement du capteur. - Mesurer les paramètres S12 du capteur. - Récupérer les fichiers S2P de l'analyseur et les tracer sous Excel. 	<ul style="list-style-type: none"> - Analyseur de réseau - Pour la calibration consulter le document <u>Calibration analyseur 2 ports</u> - Utiliser pour la caractérisation les mêmes câbles de calibration et cellule de test que ceux de la calibration. - Microsoft office Excel
4	Activation	<p>Activation de la surface des substrats</p> <p>Protocole piranha :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mettre 40ml de H2O2 (30%) - Mettre 40ml de H2SO4 (95%) - Utilisation solution 	<p>Manipulation piranha</p> <ul style="list-style-type: none"> - Manipulation sous la hotte «ACIDE » en salle Blanche - 2 paires de gants - Visière et lunette obligatoire ! <p>Récupération piranha</p> <ul style="list-style-type: none"> - Récupérer la solution dans un b�cher (dédié � ce mélange) et la laisser refroidir pendant 3h

		chaude active à 110°C pendant 10min voire 15min. - Pré-rinçage abondant avec l'eau DI - Séchage des lames de verres.	- Laisser couler l'eau sur la solution dans l'évier (5 à 10 litres) - Ecoulement d'eau pour être sûr que la conduite ne contient pas d'acides
5	Traitement de surface	Silanisation - Lavage au solvant de silanisation (toluène) - Silane est dilué dans le toluène (2% en volume) et on silanise toute une nuit à température ambiante. - Lavage toluène, éthanol puis Eau. - Réticulation pendant 30 min à 200 °C pour - stabiliser la couche organique.	- avant de plonger les capteurs bien mélanger la Solution avec un agitateur magnétique ou un Bain ultrason.
6	Préparation de la solution de MIP	1 Dans le flacon en verre, mettre l'AMP : 10 eq mol 2 Ajouter l'acrylamide : 20 eq mol 3 Ajouter le DMAEM : 1 eq mol 4 Ajouter l'EGDMA : 1ml Mélanger la solution pendant 5 minutes. 5 Ajouter le DMSO : 1 eq 6 Mettre le flacon contenant le MIP dans un bain ultrasons avec de l'eau pendant 1 heure, pour bien mélanger les constituants. 7 Purger la solution	Ce protocole a été mis en place suite à une semaine de formation à l'ICOA Orléans. - Respecter l'ordre précisé ci-contre pour le mélange des constituants. - Manipuler sous la hotte « «Solvants». - Balance de précision APX 60 (Denver Instruments). - Micropipettes - Un flacon en verre - Bain ultrasons pour mélanger la solution (Touzart Matignon 220V) - Arrivée d'azote pour purger la solution - Des gants et un masque (celui-ci est obligatoire lorsqu'on pèse le Template et l'acrylamide pour éviter d'inhaler les particules fines.) - Seringues et aiguilles (Grandes pour prélever le dry DMSO et petites pour purger la solution à l'azote). - Thermomètre. Remarques : - Ouvrir le flacon de DMAEM, prendre la quantité avec la micropipette et refermer très

		<p>à l'azote avec une seringue et une aiguille reliées au bout de la ligne d'azote (plonger la seringue profondément dans la solution).</p> <p>8 Ajouter l'AIBN : leq en mol à la fin juste avant la polymérisation, refermer le flacon, mixer dans un bain ultrason , mettre du parafilm autour du couvercle.</p> <p>9 Mettre le flacon contenant la solution dans une eau à 4° C pendant quelques minutes.</p>	<p>rapidement, injecter le contenu de la micro pipette en s'assurant que la pipette touche l'intérieur du flacon.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prendre le Dry DMSO avec une seringue (à travers le couvercle en caoutchouc), s'assurer que la seringue n'est pas contaminée. - Cette solution (AMP/Acrylamide/DMAEM/EGDMA/DMSO) sans AIBN peut être stockée au réfrigérateur. Une fois l'AIBN ajouté il faut l'utiliser immédiatement. - Mettre de l'eau dans le congélateur, sortir la glace mélanger à de l'eau et vérifier avec un thermomètre jusqu'à obtenir 4° C. A cette température les liaisons entre monomère et template sont favorisées - L'AMP se garde au congélateur, l'AIBN quant à lui se préserve au réfrigérateur dans une bouteille teintée. - Les autres produits se gardent au réfrigérateur. - Pour plus d'information consulter le fichier Stockage des produits MIP.
7	Dépôt	<ul style="list-style-type: none"> - Dépôt d'une goutte de 10 µl de MIP sur le capteur - Etalement de la solution par spin-coating 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation d'un porte substrat - Utilisation du Kapton pour délimiter le dépôt sur la zone de propagation de l'onde. - Réglage tournette pour 10 de solution MIP - V= 2000 rpm - A=4000 rpm/s - T=10 s - Retirer aussitôt le kapton® après le dépôt. - Vérification au microscope
8	Polymérisation	Polymérisation UV à 256 nm pendant 3h sous atmosphère inerte.	les substrats doivent être placés sur un plan parfaitement horizontal, bien exposé à la lampe UV et à une distance de 6cm.

9	Caractérisation	<ul style="list-style-type: none"> - Mesurer les épaisseurs des dépôts. - Analyser l'état de surface des dépôts (rugosité, homogénéité). 	<ul style="list-style-type: none"> - Profilomètre mécanique. - Profilomètre Optique.
10	Extraction des empreintes	<ul style="list-style-type: none"> - Mettre 6.25 ml d'ammoniaque (ammonium hydroxide) et 63.75 ml de H₂O pure (eau doublement distillée). - Ajouter 30 ml de méthanol (MeOH) - - Plonger les substrats dans cette solution - pendant toute une nuit dans le réfrigérateur - à 4° C. - Rincer abondamment avec l'eau (4 fois). - Laver au méthanol. 	La solution (ammoniaque 100 mM/Méthanol (70/30 v/v)) peut être gardée au réfrigérateur pour une utilisation ultérieure.
11	Caractérisation	<ul style="list-style-type: none"> - Analyser l'état de surface des dépôts après extraction du template. 	<ul style="list-style-type: none"> - Profilometre mécanique. - Profilometre Optique.
12	Caractérisation électrique	<ul style="list-style-type: none"> - Calibrer l'analyseur de réseau sur la bonne gamme de fréquences. - Mesurer les paramètres S12. - Récupérer les fichiers S2P de l'analyseur et les tracer sous Excel. - Comparer avec les courbes de gain avec celles tracées avant dépôt. - 	<ul style="list-style-type: none"> - Analyseur de réseau - Pour la calibration consulter le document <u>Calibration analyseur 2 ports</u> - Utiliser pour la caractérisation les mêmes câbles de calibration et cellule de test que ceux de la calibration. - Microsoft office Excel.

Annexe 3

Principe du MEB

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB) est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émergents de la surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée et permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ.

Cette méthode de caractérisation présente une résolution spatiale dans les conditions optimales (constructeurs) d'environ 50 Å. Cette résolution varie en fonction de la taille de la sonde. Elle est réduite à 500 Å, voire 1000 Å dans des conditions réelles et elle peut être améliorée par le traitement d'image. L'autre avantage de cette technique est l'effet tridimensionnel sur l'image du à la grande profondeur de champ (~ 1 mm pour un grossissement de $\times 10$; ~ 2 μ m pour un grossissement de $\times 10,000$) ainsi qu'au contraste produit par les électrons secondaires provenant des zones cachées vis à vis du détecteur. La limite de grandissement pour ce genre d'appareil est de ($\times 100\,000$) ; pour des appareils à canon classique, le grandissement efficace Ge est de l'ordre de $\times 20,000$ à $\times 40,000$. Le MEB peut également donner des informations sur la nature chimique des objets observés par le biais du spectre x généré par le bombardement électronique (X-Ray Emission Spectroscopy XES) (P.Cazenave et al. 2010).

Dans une colonne mise sous vide à une pression résiduelle de 10^{-4} à 10^{-6} Torr, un canon à électrons constitué à partir d'un filament de tungstène ou de LaB6 (Hexaborure de Lanthane) génère un faisceau d'électrons qui sont accélérés sous 2 à 40 kV. Ce faisceau est focalisé par des lentilles électroniques en une tache de faible diamètre à la surface de l'échantillon. La finesse de cette tache conditionne la grande profondeur de champ de l'observation.

Sous l'impact du bombardement électronique l'échantillon émet essentiellement trois radiations utiles : des électrons secondaires, des électrons rétrodiffusés et des rayons x qui sont en partie captés par des détecteurs appropriés.

Le détecteur d'électrons émis délivre un signal électrique proportionnel au nombre d'électrons qu'il reçoit par unité de temps. Ce signal passant par un amplificateur, commande l'intensité du faisceau d'électrons d'un tube cathodique et donc, la brillance du spot sur son écran.

Un générateur de balayage (dents de scie) horizontal (ligne) et vertical (trames) alimente en même temps les bobines de réflexion du tube cathodique et celles de la colonne. On a donc un balayage du faisceau sur l'échantillon en synchronisme avec le balayage du spot sur l'écran. A chaque valeur de flux d'émission électronique local (dépendant de la nature et du relief de l'échantillon) correspond une brillance du spot. L'image de l'échantillon est ainsi restituée sur l'écran par une analyse point par point analogue à celle utilisée en télévision. Le détecteur d'électrons est un scintillateur associé à un photomultiplicateur. On utilise une grille à un potentiel positif pour améliorer la collection.

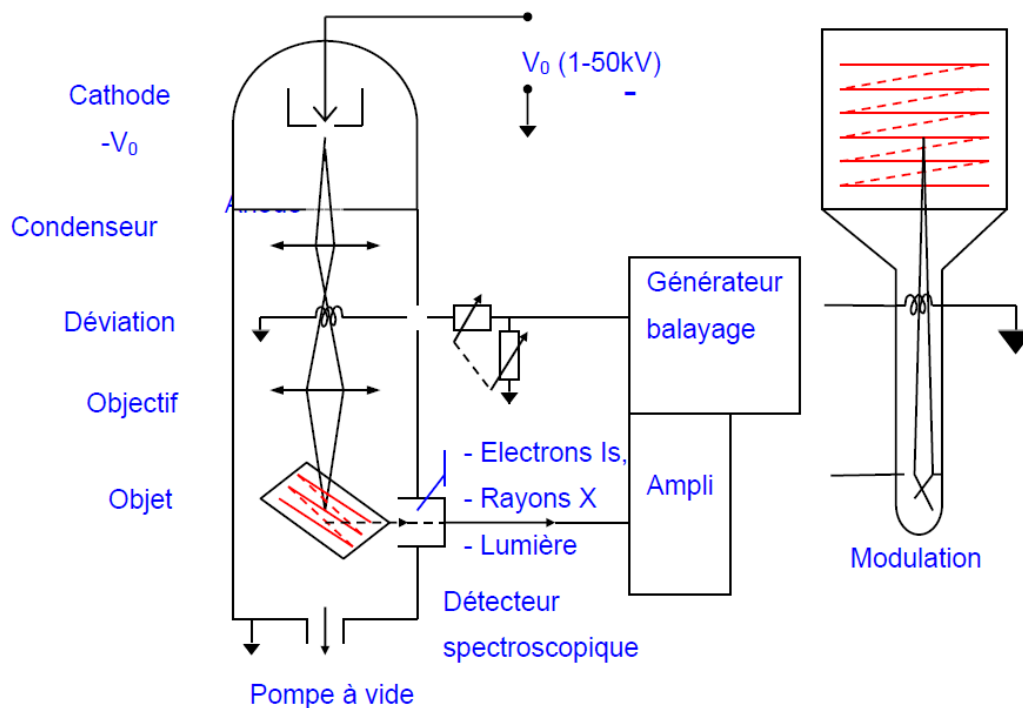


Figure : Schéma de principe d'un MEB.



Exemple d'un MEB équipé d'un système d'analyse X par dispersion d'énergie et d'un processeur d'image (Laboratoire IMS).

Références bibliographiques

- (P. Abgrall *et al.*, 2007) P. Abgrall, A.M. Gue, Lab-on-a-Chip Technologies: Making a Microfluidic Network and Coupling It into a Complete Microsystem — A Review. *J. Micromech. Microeng.* 2007, vol. 17, p. 15-49.
- (L. Agrofoglio *et al.*, 2010) L. A. Agrofoglio, D. Rebière, R. Vidal, H. Bénech, F. Lévi, document scientifique capteurs a empreintes moléculaires Polymériques de nucleosides modifiés pour un suivi, non-invasif, de thérapies de cancers, *AAP TECSAN EDITION Projet CancerSensor*, 2010.
- (CH. Ahn *et al.*, 2004) CH. Ahn, JW. Choi, G. Beaucage, JH. Nevin, JB. Lee, A. Puntambekar, Disposable smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics. *Proc IEEE* 2004, vol. 92, p. 154–73.
- (D. Arruda *et al.*, 2009) D. Arruda, W. Wilson, C. Nguyen, Q. Yao, R. Caiazzo, I. Talpasanu, D. Dow, B. Liu, Microelectrical sensors as emerging platforms for protein biomarker detection in point of care diagnostics, *Expert reviews*, 2009, pp. 749-755.
- (P-A. Auroux *et al.*, 2002) P.A. Auroux, D. Iossifidis, D.-R. Reyes, A. “Manz, Micro Total Analysis Systems Analytical Standard Operations and Applications”, *Anal. Chem.*, 2002, vol. 74, n° 12, p. 2637-2652. DOI : 10.1021/ac020239t
- (M. Avila *et al.*, 2007) M. Ávila, M. Zougagh, A. Escarpa, Á. Ríos , Supported liquid membrane-modified piezoelectric flow sensor with molecularly imprinted polymer for the determination of vanillin in food samples, *Talanta*, 2007, vol. 72, N° 4, 15, p. 1362-1369.
- (M. Avila *et al.*, 2008) M. Avila, M. Zougagh, A. Escarpa, A. Ríos, Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules, *Trends in Analytical Chemistry* 2008, vol. 27, N°. 1.
- (H. Becker *et al.*, 2008) H. Becker, C. Gärtner, Polymer Microfabrication Technologies for Microfluidic Systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, vol.390, p.89-111.
- (M.C. Belanger *et al.*, 2001) Belanger, M. C., Marois, Y. *J Biomed Mater Res* (2001 , vol.58, p. 467-77.

(A.-S. Belmont *et al.*, 2007) A.-S. Belmont, S. Jaeger, D. Knopp, R. Niessner, G. Gauglitz, K. Haupt, “Molecularly imprinted polymer films for reflectometric interference spectroscopic sensors”, *Biosensors and Bioelectronics*, 15 Juin 2007, vol. 22, n° 12, p. 3267–3272. DOI. : 10.1016/j.bios.2007.01.023

(G. Besselink *et al.*, 2004) Besselink GAJ, Kooyman RPH, van Os PJHJ, Engbers GHM, Schasfoort RBM. Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen. *Anal Biochem* 2004,vol. 333, p.165–73.

(M.C. Blanco *et al.*, 2004) M.C. Blanco-López, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, vol. 23, N° 1, p. 36-48.

(F. Breton *et al.*, 2009) F. Breton, R. Delepee, L. A. Agrofoglio, “Molecular imprinting of AMP by an ionic noncovalent dual approach”, *J. Sep. Sci.*, vol. 32, p. 3285–3291. DOI. : *J Sep Sci.* 2009 Oct,32(19 :3285-91. doi: 10.1002/jssc.200900226.

(JWM. Bulte *et al.*, 2008) Bulte JWM, Modo MMJJ. Nanoparticles in biomedical imaging: emerging technologies and applications. *Springer*, NY, USA, 2008.

(M. Cadinot, 2008) M. Cadinot, Nouveaux procédés d’élaboration de polymères a empreintes moléculaires. Thèse : Chimie Macromoléculaire, 2008. Institut national des sciences

(Cancer Research UK, 2011) CancerStats Cancer Worldwide, Cancer Research UK, 2011.

(E. Caro *et al.*, 2003) E. Caro, R. M. Marcé, P. A.G. Cormack, C. Sherrington, F. Borrull, On-line solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-nitrophenol from water, *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 995, N° 1–2, p. 233-238.

(S. Carraraa *et al.*, 2009) S. Carraraa, V. Bhalla, C. Stagnia, L. Benini, A. Ferretti, F. Valle, A. Gallotta, B. Riccò, B. Samorì, Label-free cancer markers detection by capacitance biochip, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009, vol. 136, N° 1, p. 163–172.

(X. Chen *et al.*, 2005) X. Chen, A Non-invasive Detection of Lung Cancer Combined Virtual Gas Sensors Array with Imaging Recognition Technique, Proceedings of the 2005 IEEE, Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference, Shanghai, China, 2005.

(I. Chianella *et al.*, 2002) Chianella I, Lotierzo M, Piletsky S, Tothill IE, Chen B, Turner APF. Rational design of a polymer specific formicrocystin-LR using a computational approach. *Anal Chem*, 2002, vol. 74, p. 1288–93.

(I. Chianella *et al.*, 2006) Chianella I, Karim K, Piletska EV, Preston C, Piletsky SA. Computational design and synthesis of molecularly imprinted polymers with high binding capacity for pharmaceutical applications-model case: Adsorbent for abacavir. *Anal Chim Acta*, 2006, vol. 559, p.73–8.

(C-D. Chin *et al.*, 2007) C.-D. Chin, V. Linder, S.-K. Sia, “Lab-on-a-Chip Devices for Global Health: Past Studies and Future Opportunities”, *Lab Chip*, 2007, vol. 7, p. 41-57.

(T.M. Chinowsky *et al.*, 2003) Chinowsky, T.M., Quinn, J.G., Bartholomew, D.U., Kaiser, R., Elkind, J.L. Performance of the Spreeta 2000 Integrated Surface Plasmon Resonance Affinity Sensor. *Sens. Actuat. B*, 2003, vol. 91, p. 266-274.

(V. Choesmel, *et al.* 2004) Choesmel V, Pierga JY, Nos C, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Thierry JP, *et al.* Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. *Breast Cancer Res*, 2004, vol. 6, p. R556– 70.

(SF. Chou *et al.*, 2002) Chou SF, Hsu WL, Hwang JM, Chen CY. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on a quartz crystal microbalance. *Anal Chim Acta*, 2002, vol. 453, N° 2, p. 181–9.

(S.F. Chou *et al.*, 2004) Chou S-F, Hsu WL, Hwang JM, Chen CY. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron*, 2004, vol. 19, p. 999–1005.

(J. Clairambault, 2008) J. Clairambault, A Step Toward Optimization of Cancer Therapeutics, Physiologically Based Modeling of Circadian Control on Cell Proliferation, *IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY MAGAZINE*, 2008.

(B. Claude, 2007) B. Claude, Intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la préparation d'échantillons par extraction solide-liquide. Applications aux triterpènes dans les plantes et aux dopants dans les urines. Thèse 2007, Chimie Analytique. Université d'Orléans.

(B. Cohen, 2006) B. Cohen, Biomimetics—Using Nature as an Inspiring Model for Innovation, Jet Propulsion Laboratory, National Aeronautics and Space Administration:

Pasadena, CA, USA, 2006. Disponible en ligne à l'adresse: <http://www.mdpi.com/2079-6374/3/1/89/htm#sthash.P9fULEXN.dpuf>

(JR. Collett *et al.*, 2005) Collett JR, Cho EJ, Lee JF, LevyM, Hood AJ, Wan C, *et al.* Functional RNAmicroarrays for high-throughput screening of antiprotein aptamers. *Anal Biochem*, 2005, vol. 338, p. 113–23.

(P-A.G. Cormack *et al.*, 2004) P.A.G Cormack, A.Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization Review, *Journal of Chromatography B*, 2004, vol. 804, N° 1, 5, p. 173-182.

(J. Courtois, 2006) J. COURTOIS, Monolithic Separation Media Synthesized in Capillaries and their Applications for Molecularly Imprinted Networks. Thèse: Chimie analytique. Université d'UMEA. Disponible à l'adresse: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:145067/FULLTEXT01.pdf>.

(J. Courtois, M. Szumski, *et al.*, 2006) J. Courtois, M. Szumski, E. Byström, A. Iwasiewicz, A. Shchukarev, K. Irgum, “A Study of Surface Modification and Anchoring Techniques used in the Preparation of Monolithic Micro-columns in Fused Silica Capillaries”, *Journal of Separation Science*, Janvier 2006, vol. 29, n° 1, p. 14–24. DOI : J Sep Sci. 2006 Jan,29(1 :14-24.

(G. D'Agostino *et al.*, 2006) G. D'Agostino, G. Alberti, R. Biesuz, M. Pesavento, Potentiometric sensor for atrazine based on a molecular imprinted membrane Original Research Article *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, vol. 22, N° 1, p. 145-152.

(Z. Dai *et al.*, 2003) Dai Z, Yan F, Chen J, Ju H. Reagentless amperometric immunosensors based on direct electrochemistry of horseradish peroxidase for rapid determination of carcinoma antigen-125. *Anal Chem*, 2003, vol. 75, p. 5429–34.

(Z. Dai *et al.*, 2005) Dai Z, Chen J, Yan F, Ju H. Electrochemical sensor for immunoassay of carcinoembryonic antigen based on thionine monolayer modified gold electrode. *Cancer Detect Prev* 2005, vol. 29, p. 233–40.

(K. Das *et al.*, 2003) K. Das, J. Penelle, V.M. Rotello, Selective picomolar detection of hexachlorobenzene in water using a quartz crystal microbalance coated with a molecularly imprinted polymer thin film. *Langmuir, American Chemical Society* 19 Mars 2003, vol. 19, n° 9, p.3921-3925. DOI : 10.1021/la026781u.

(IB. DeRoock *et al.*, 2001) DeRoock IB, Pennington ME, Sroka TC, Lam RS, Bowden GT, Bair EL, Synthetic peptides inhibit adhesion of human tumor cells to extracellular matrix proteins. *Cancer Res* 2001, vol. 61, p. 3308–13.

(F-L. Dickert *et al.*, 2004) F. L. Dickert, P. Lieberzeit, S. G. Miarecka, K. J. Mann, O. Hayden, C. Palfinger, Synthetic receptors for chemical sensors- subnano- and micrometre patterning by imprinting techniques, *Biosensors and Bioelectronics* 2004, vol. 20, N° 6, p. 1040-1044.

(F.L. Dickert *et al.*, 2007) F.L. Dickert, P.A. Lieberzeit, Chemical and Biological Applications of the QCM Imprinted Polymers in Chemical Recognition for Mass-Sensitive Devices, *Springer Series On Chemical Sensors And Biosensors*, 2007.

(D. Du *et al.*, 2003) Du D, Yan F, Liu SL, Ju HX. Immunological assay for carbohydrate antigen 19-9 using an electrochemical immunosensor and antigen immobilization in titania sol–gel matrix. *J Immunol Methods*, 2003, vol. 283, p. 67–75.

(C. Easley *et al.*, 2006) Easley, C., Karlinseq, J.M., Bienvenue, J.M., Legendre, L.A., Roper, M.G., Feldman, S.H., Hughes, M.A., Hewlett, E.L., Merkel, T.J., Ferrance, J.P., Landers, J.P. A Fully Integrated Microfluidic Genetic Analysis System with Sample-in-Answer-out Capability. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, vol. 103, p. 19272-19277.

(B-S. Ebarvia *et al.*, 2004) Ebarvia BS, Binag CA, Sevilla F, Biomimetic piezoelectric quartz sensor for caffeine based on a molecularly imprinted polymer. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2004, vol. 378, N°5, p.1331-7.

(B-S. Ebarvia *et al.*, 2005) Benilda S. Ebarvia, F., Piezoelectric quartz sensor for caffeine based on molecularly imprinted polymethacrylic acid, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005, vol. 107, N° 2, p. 782-790.

(JN. Eble, *et al.*, 2004) Eble JN., Sauter G., Epstein JI., Sesterhenn IA., World Health Organization classification of tumours. pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press, 2004.

(L. Elisabeth *et al.*, 2008) L. Elisabeth, Matériaux mésomorphes a empreinte moléculaire pour le développement d'un capteur de pesticides. Thèse: Chimie industrielle, polymères. Université de Toulouse. Disponible à l'adresse : http://thesesups.ups-tlse.fr/848/1/Laurent_Elisabeth.pdf

(Barbas et al, 1997) Barbas et al, Immune versus Natural Selection: Antibody Aldolases with Enzymic Rates but Broader Scope. *Science*, 1997, vol. 278, p. 2085-2092.

(K.Seidler *et al.*, 2009) Seidler, K., Polreichová, M., Lieberzeit, P.A., Dickert, F.L. Biomimetic yeast cell typing-application of QCMs. *Sensors* 2009, vol. 9, p. 8146–8157.

(C. Fernandez-Sanchez *et al.*, 2004) Fernandez-Sanchez C, McNeil CJ, Rawson K, Nilsson O. Disposable noncompetitive immunosensor for free and total prostate-specific antigen based on capacitance measurement. *Anal Chem* 2004, vol. 76, p. 5649–56.

(G. Fischerauer, 1996) Fischerauer, G., Dickert, F., Forth, P., Knauer, Chemical sensors based on SAW resonators working at up to 1 GHz, *IEEE Ultrasonics Symposium*, Proceedings, 1996, vols. 1 et 2, p. 439-442.

(Y. Fu *et al.*, 2003) Yi Fu, Harry O., Finklea, H. O., Phillippi, M. A., Lomper, E., Grate, J. W., Quartz Crystal Microbalance Sensor for Organic Vapor Detection Based on Molecularly Imprinted Polymers, *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75 N°20, p. 5387–5393. DOI: 10.1021/ac034523b.

(P. Gascoyne *et al.* 2004) Gascoyne, P., Satayavivad, J., Ruchirawat, M. Microfluidic Approaches to Malaria Detection. *Acta Tropica*, 2004, vol. 89, p. 357-369.

(R. Ghosh, 2006) R. Ghosh, Principles of bioseparations engineering, McMaster University, Canada, World Scientific, 2006.

(R. Gomez *et al.*, 2001) R. Gomez, R. Bashir, A. Sarikaya, “Microfluidic Biochip for Impedance Spectroscopy of Biological Species”, *Biomed. Microdevices*, vol. 2001, n° 3, Septembre, p. 201-209. DOI : 10.1023/A:1011403112850

(MC. Green *et al.*, 2000) Green MC, Murray JL, Hortobagyi GN, Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat Rev*, 2000, vol. 26, p. 269–86.

(P. Grossoa *et al.*, 2010) P. Grosso, S. Carrarab, C. Stagni, L. Benini, Cancer marker detection in human serum with a point-of-care low-cost system, *Sensors and Actuators B* 2010, vol. 147,p. 475–480.

(JG. Guan *et al.*, 2004) Guan JG, Miao YQ, Chen JR. Prussian blue modified amperometric FIA biosensor: one-step immunoassay for alpha-fetoprotein. *Biosens Bioelectron* 2004, vol. 19, p. 789–94.

(A. Gültekin *et al.*, 2014) Gültekin, A., Karanfil, G., Kus, M., Sönmezoglu, S., Say, R., Preparation of MIP-based QCM nanosensor for detection of caffeic acid, *Talanta*, vol. 119, p. 533-537. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.11.053

(A. Gültekin *et al.*, 2014) Gültekin, A., Karanfil, G., Sönmezoglu, S., Say, R. , Development of a highly sensitive MIP based-QCM nanosensor for selective determination of cholic acid level in body fluids, *Materials Science and Engineering: C*, 2014, vol. 42, p. 436-442. DOI: 10.1016/j.msec.2014.05.055.

(CG. Gunawardana *et al.*, 2007) Gunawardana CG, Diamandis EP. High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens. *Cancer Lett*, 2007, vol. 249, p. 110–9.

(BB. Haab *et al.* 2005) Haab BB. Antibody arrays in cancer research. *Mol Cell Proteomics*, 2005, vol. 4, p. 377–83.

(K.M. Hansen *et al.*, 2005) Hansen KM, Thundat T. Microcantilever biosensors. *Methods*, 2005, vol.37, p. 57–64.

(K. Haupt *et al.*, 2012) K. Haupt, M. Bombart, C. Ayela, “Micro and Nanofabrication of Molecularly Imprinted Polymers”, Molecular Imprinting éd. *Springer*, vol. 325, p. 83-110. DOI : 10.1007/128_2011_308

(K. Haupt *et al.*, 1999) K. Haupt, K. Noworyta, W. Kutner, Imprinted polymer-based enantioselective acoustic sensor using a quartz crystal microbalance, *Anal. Commun.*, 1999, vol. 36, p. 391-393. DOI: 10.1039/A907844D.

(O. Hayden *et al.*, 2006) Hayden, O., Haderspöck, C., Krassnig, S., Chen, X., Dickert, F.L. Surface imprinting strategies for the detection of trypsin. *Analyst* 2006, vol. 131, p. 1044–1050. Disponible en ligne à l’adresse: <http://www.mdpi.com/2079-6374/3/1/89/htm#sthash.P9fULEXN.dpuf>

(Q. He *et al.*, 2011) Q. He, F. Severac, H. Hajjoul, Y. Viero, A. Bancaud, “Directed Assembly of Nanoparticles along Predictable Large-Scale Patterns Using Micromolded Hydrogels”, *American Chemical Society*, vol. 9, p. 7–55. DOI : 10.1021/la200064n/Langmuir 2011, 27, 6598–6605.

(Z. He *et al.* 2003) He Z, Gao N, Jin W. Determination of tumor marker CA125 by capillary electrophoretic enzyme immunoassay with electrochemical detection. *Anal Chem Acta* 2003, vol. 497, p. 75–81.

(O.Y.F. Henry *et al.*, 2010) Mueller, L., Sinn, S., Drechsel, H., Ziegler, C., Wendel, H., Northoff, H., Gehring, F.K. Investigation of prothrombin time in human whole-blood samples with a quartz crystal biosensor. *Anal. Chem.*, 2010, vol.82, p. 658–663.

(HC. Hu, *et al.* 2003) Hu XC, Wang Y, Shi DR, Loo TY, Chow LW. Immunomagnetic tumor cell enrichment is promising in detecting circulating breast cancer cells. *Oncology* 2003, vol. 64, p. 160–5.

(F. Hua *et al.*, 2004) Hua, F., Sun, Y., Gaur, A., Meitl, M. A., Bilhaut, L., Rotkina, L., Wang, J., Geil, P., Shim, M., Rogers, J.A. *Nano letters* 2004, vol. 4, p. 2467-2472.

(H.-C. Huang *et al.*, 2004) H.-C. Huang, C.-I. Lin, A.-K. Joseph, Y.-D. Lee, “Photolithographically impregnated and molecularly imprinted polymer thin film for biosensor applications”, *Journal of Chromatography A*, 20 Février 2004, vol. 1027, p. 263–268. DOI : 10.1016/j.chroma.2003.08.106

(M. Hussain *et al.*, 2013) M. Hussain, J. Wackerlig, P. A. Lieberzeit, Biomimetic Strategies for Sensing Biological Species, *Biosensors*, 2013, vol. 3, N°1, p. 89-107, DOI:10.3390/bios3010089.

(C.C. Hwang *et al.*, 2002) Hwang, C.C., Lee, W.C., Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods, *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 962, N°1-2, p.69-78. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00559-9.

(INCa, 2011) La situation du cancer en France en 2011, Collection Rapports & synthèses, ouvrage collectif édité par l’INCa, Boulogne-Billancourt, 2011.

(C. Ionescu-Zanetti *et al.*, 2005) C. Ionescu-Zanetti, R.M. Shaw, J. Seo, Y.N. Jan, L.Y Jan, L.P. Lee, Mammalian Electrophysiology on a Microfluidic Platform. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, vol. 102, p.9112-9117.

(N. Iqbal *et al.*, 2014) Iqbal N, Afzal A, Mujahid A, layer-by-layer assembly of low-temperature-imprinted poly(methacrylic acid /gold nanoparticle hybrids for gaseous

formaldehyde mass sensing, *RSC Advances Journal*, 2014, vol. 4, N° 81, p. 43121-43130. DOI: 10.1039/C4RA06230B

(D. Jégourel *et al.*, 2008) Jégourel D, Delépée R, Breton F, Rolland A, Vidal R, Agrofoglio LA. Molecularly imprinted polymer of 5-methyluridine for solid-phase extraction of pyrimidine nucleoside cancer markers in urine. *Bioorg Med Chem* 2008, vol.16, p. 8932–9.

(M. Jenik *et al.*, 2009) Jenik, M., Seifner, A., Krassnig, S., Seidler, K., Lieberzeit, P.A., Dickert, F.L., Jungbauer, C. Sensors for bioanalytes by imprinting—Polymers mimicking both biological receptors and the corresponding bioparticles. *Biosens. Bioelectron.* 2009, vol. 25, p. 9–14.

(A. Jeppsson-Dadoun *et al.*, 2013) Jeppsson-Dadoun A, Andersson LI, Hashemi M, Colmsjö A, Abdel-Rehim M., Molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent for the simultaneous determination of local anesthetics: lidocaine, ropivacaine, mepivacaine and bupivacaine in plasma and urine samples, *Biomed Chromatogr.* 2013, vol. 27, N°11, p. 1481-8. DOI: 10.1002/bmc.2946.

(M. Jewett, 1999) M. Jewett, D. Forger, R. Kronauer, Revised limit cycle oscillator model of human circadian pacemaker, *J. Biol. Rhythms* , 1999, vol. 14, no. 6, p. 493–499.

(S.K. Jha *et al.*, 2014) Jha, S.K., Liu, C.J., Hayashi, K., Molecular imprinted polyacrylic acids based QCM sensor array for recognition of organic acids in body odor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, vol. 204, p. 74-87. DOI: 10.1016/j.snb.2014.07.098

(H-S, Ji *et al.*, 1999) H.-S. Ji, S. McNiven, K. Ikebukuro, I. Karube, Selective piezoelectric odor sensors using molecularly imprinted polymers, Original Research Article, *Analytica Chimica Acta*, 1999, vol. 390, N° 1–3, p. 93-100.

(E.A.C. Johnson *et al.*, 2009) Johnson, E.A.C., Bonser, R.H.C., Jeronimidis, G. Recent advances in biomimetic sensing technologies. *Phil. Trans. Roy. Soc. A*, 2009, vol. 367, p. 1559–1569.

(G.V. Kaigala *et al.*, 2006) Kaigala, G.V., Huskins, R.J., Preiksaitis, J., Pang, X.-L., Pilarski, L.M., Backhouse, C.J. Automated Screening Using Microfluidic Chip-based PCR and Product Detection to Assess Risk of BK Virus-associated Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, p. 3753-3763.

(D.A. Karlin *et al.*, 1985) D. A. Karlin, A. J. Mastromarino, R. D. Jones, J. R. Stroehlein, O. Lorentz, Fecal skatole and indole and breath methane and hydrogen in patients with large bowel polyps or cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1985 vol. 109, p. 135–141.

(M Kempe, 1996) M. Kempe, Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC, *Analytical chemistry*, 1996, vol. 68, N°11, p. 1948-1953. DOI: 10.1021/ac9512160.

(E. Klerman, 1999) E. Klerman, Y. Lee, C. Czeisler, and R. Kronauer, Linear demasking techniques are unreliable for estimating the circadian phase of ambulatory temperature data, *J. Biol. Rhythms*, 1999, vol. 14, no. 4, pp. 260–274.

(K. Kojima *et al.*, 2003) Kojima K, Hiratsuka A, Suzuki H, Yano K, Ikebukuro K, Karube I. Electrochemical protein chip with arrayed immunosensors with antibodies immobilized in a plasma-polymerized film. *Anal Chem* 2003, vol. 75, p. 1116–22.

(M. Komiyama *et al.*, 2003) M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma, Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2003.

(D.R. Kryscio *et al.*, 2012) D.R. Kryscio, N.A. Peppas, “Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers”, *Acta Biomaterialia*, Février 2012, vol. 8, n°. 2, p. 461–473. DOI : 10.1016/j.actbio.2011.11.005. Epub 2011 Nov 11.

(R. Kucherlapati *et al.*, 2012) R. Kucherlapati, Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer, *Nature* 2012, vol. 487, p. 330-337.

(T. Kunitake *et al.*, 2004) T. Kunitake, S.-W. Lee, “Molecular imprinting in ultrathin titania gel films via surface sol-gel process”, *Anal. Chim. Acta*, Février 2004, vol. 504, n° 1, p.1-6. DOI : 10.1016/S0003-2670(03)00811-0

(E.T. Lagally *et al.*, 2000) E.-T. Lagally, P.-C. Simpson, R.A. Mathies, “Monolithic Integrated Microfluidic DNA Amplification and Capillary Electrophoresis Analysis System”, *Sens. Actuat. B*, 2000, vol. 63, p. 138-146.

(O. Lazcka *et al.*, 2007) O. Lazcka, F.J. Del Campo, F.X. Muñoz, “Pathogen Detection: A Perspective of Traditional Methods and Biosensors”, *Biosens. Bioelectron.* 15 Février 2007, vol. 22, n° 7, p. 1205-1207. DOI : 10.1016/j.bios.2006.06.036

(J.G. Lee *et al.*, 2006) Lee, J.-G., Cheong, K.H., Huh, N., Kim, S., Choi, J.-W., Ko, C. Microchip-Based One Step DNA Extraction and Real-time PCR in one Chamber for Rapid Pathogen Identification. *Lab Chip* 2006, vol. 6, p. 886-895.

(F. Levi 2002) F. Levi, From circadian rhythms to cancer chronotherapeutics, *Chronobiol. Int.*, 2002, vol. 19, N° 1, p. 1–19.

(X. Li *et al.*, 2006) X. Li, S.M. Husson, “Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study”. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, vol. 22, n° 3, p. 336-348. DOI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753292>

(RP. Liang *et al.* 2004) Liang RP, Qiu JD, Zou XY, Cai PX. Breast cancer antigen immunosensor based on the functional sol–gel film. *Chem J Chin Univ*, 2004, vol. 25, p. 425.

(C. Liang *et al.*, 1999) C. Liang, H. Peng, X. Bao, L. Nie, S. Yao, Study of a molecular imprinting polymer coated BAW bio-mimic sensor and its application to the determination of caffeine in human serum and urine, *Analyst*, 1999, vol. 124, p. 1781-1785. DOI: 10.1039/A905112K, Paper.

(H. Liao *et al.*, 2004) H. Liao, Z. Zhang, L. Nie, S. Yao, Electrosynthesis of imprinted polyacrylamide membranes for the stereospecific l-histidine sensor and its characterization by AC impedance spectroscopy and piezoelectric quartz crystal, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, vol. 59, N° 1, p. 75-87.

(P.A. Lieberzeit *et al.*, 2005) P.A. Lieberzeit, S. Gazda-Miarecka, K. Halikias, C. Schirk, J. Kauling, F.L. Dickert, “Imprinting as a versatile platform for sensitive materials-nanopatterning of the polymer bulk and surfaces”, *Sensor. Actuat. B*, Novembre 2005, vol. 111-112, p. 259-263. DOI : 10.1016/j.snb.2004.12.064

(P.A. Lieberzeit *et al.*, 2014) Lieberzeit, P.A., Jungmann, C., Schranzhofer, L., Molecular Imprinting on the Nanoscale - Rapid Detection of Ag Nanoparticles by QCM Sensors, *Procedia Engineering*, vol. 87, p. 236-239. DOI: 10.1016/j.proeng.2014.11.630.

(B. Liederg *et al.*, 1998) B. Liederg, J.M. Cooper, Immobilized Biomolecules in Analysis: A Practical Approach, *Oxford University Press*, Oxford, U.K., 1998.

(JH. Lin *et al.*, 2004) Lin JH, Yan F, Ju HX. Simple noncompetitive enzyme immunoassay for carcinoembryonic antigen by flow injection chemiluminescence. *Clin Chim Acta* 2004, vol. 341, p. 109–15.

(J. Lin *et al.* 2005) Lin J, Ju H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. *Biosens Bioelectron* 2005, vol. 20, p. 1461–70.

(T.Y. Lin *et al.*, 2004) Lin, T.Y., Hu, C.H., Chou, T.C., Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, vol. 20, N°1, p.75-81. DOI: 10.1016/j.bios.2004.01.028.

(N. Liu *et al.* 2014) Liu, N., Li, X.L., Ma, X.H., Ou, G.R., Gao, Z.X., Rapid and multiple detections of staphylococcal enterotoxins by two-dimensional molecularly imprinted film-coated QCM sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 191, p. 326-331. DOI: 10.1016/j.snb.2013.09.086.

(L. Lu *et al.*, 2012) Lu, L., Zhang, Y., Tang, S., Fang, Z., Yang, H., Chen, X., Chen, G. Sensing HIV related protein using epitope imprinted hydrophilic polymer coated quartz crystal microbalance. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, vol. 31, p. 439–444.

(C. Luo *et al.*, 2001) C. Luo, M. Liu, Y. Mo, J. Qu, Y. Feng, Thickness-shear mode acoustic sensor for atrazine using molecularly imprinted polymer as recognition element, *Analytica Chimica Acta*, 2001, vol. 428, N° 1, p. 143-148.

(G.A. Luurtsema, 1997) LUURTSEMA, Gregory A. Spin coating for rectangular substrates. Thèse : Ingénierie électrique et sciences informatiques. Université de Californie, Berkley, 11 Juillet 1997. Disponible à l'adresse: <http://bcam.berkeley.edu/ARCHIVE/theses/gluurtsMS.pdf>

(M. Matsuguchi *et al.*, 2006) Matsuguchi, M., Uno, T., Molecular imprinting strategy for solvent molecules and its application for QCM-based VOC vapor sensing, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, vol. 113, N°1, p. 94-99. DOI: 10.1016/j.snb.2005.02.028.

(MJ. McGuire *et al.*, 2004) McGuire MJ, Sykes KF, Samli KN, Timares L, Barry MA, Stemke-Hale K, *et al.* A library-selected, Langerhans cell-targeting peptide enhances an immune response. *DNA Cell Biol*, 2004, vol. 23, p. 742–52.

(MJ. McGuire *et al.* 2004) McGuire MJ, Samli KN, Johnston SA, Brown KC. In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo. *J Mol Biol*, 2004, vol. 342, p. 171–82.

(Official Methods of Analysis, 1990) Official Methods of Analysis, 15th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 1990, p. 758.

(D. Meyerhofer, 1987) D. Meyerhofer, "Characteristics of Resist Films Produced by Spinning" *Journal of Applied Physics*, vol. 49, p. 3993. DOI : <http://dx.doi.org/10.1063/1.325357>

(M.E. Meyerhoff *et al.*, 1994) E. Hietanen, H. Bartsch, J. C. Bereziat, A. M. Camus, S. McClinton, O. Eremin, L. Davidson, and P. Boyle, Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: A case-control study, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1994, vol. 48, p. 575–586.

(M.E. Meyerhoff *et al.*, 1995) Meyerhoff ME, Duan C, Meusel M. Novel non-separation sandwich-type electrochemical enzyme immunoassay system for detecting marker proteins in undiluted blood. *Clin Chem* 1995, vol. 41, p. 1378–84.

(V.M. Mirsky *et al.*, 1999) Vladimir M. Mirsky, Thomas Hirsch, Sergey A. Piletsky, Otto S. Wolfbeis, A Spreader-Bar Approach to Molecular Architecture: Formation of Stable Artificial Chemoreceptors, *Angewandte Chemie International Edition* 1999, vol. 38, N° 8, p. 1108–1110. DOI: 10.1002/(SICI 1521-3773(199904)19

(M.M. Moein *et al.*, 2014) Moein, M.M., Jabbar, D., Colmsjö, A., Abdel-Rehim, M., A needle extraction utilizing a molecularly imprinted-sol-gel xerogel for on-line microextraction of the lung cancer biomarker bilirubin from plasma and urine sample, *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1366, p. 15-23. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.09.012.

(N. Moll *et al.*, 2007) N. Moll, « Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries », Thèse de doctorat, Université Bordeaux I, Bordeaux, 2007.

(D.M. Morens *et al.*, 2004) D.-M. Morens, G.K. Folkers, A.-S. Fauci, "The Challenge of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases". *Nature*, 8 juillet 2004, vol. 430, p. 242-249. DOI : 10.1038/nature02759

(M. MOSER, 2008) M. MOSER, The Symphony of Life, Importance, Interaction, and Visualization of Biological Rhythms, CHRONOBIOLOGICAL INVESTIGATIONS, *IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY MAGAZINE*, 2008.

(C. Mott, 2011) C. Mott, Model-Based Human Circadian Phase Estimation Using a Particle Filter, *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*, 2011, vol. 58, N°. 5.

(L. Mueller *et al.*, 2010) Mueller, L., Sinn, S., Drechsel, H., Ziegler, C., Wendel, H., Northoff, H., Gehring, F.K. Investigation of prothrombin time in human whole-blood samples with a quartz crystal biosensor. *Anal. Chem.*, 2010, vol. 82, p. 658–663.

(R. Mukhopadhyay *et al.*, 2007) Mukhopadhyay, R. When PDMS Isn't the Best. *Anal. Chem.* 2007, vol. 9, p. 3248-3253.

(N. Nakamura *et al.* 2001) Nakamura N, Lim TK, Jeong JM, Matsunaga T. Flow immunoassay for detection of human chorionic gonadotrophin using a cation exchange resin packed capillary column. *Anal Chim Acta*, 2001, vol, 439, p. 125–30.

(F. Navarro-Villoslada *et al.*, 2007) F. Navarro-Villoslada, J.L. Urraca, M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, Zearalenone sensing with molecularly imprinted polymers and tailored fluorescent probes, *Sens. Actuators. Part B*, 2007, vol. 121, p. 67.

(CK. O'Sullivan, 2002) O'Sullivan CK. Aptasensors: the future of biosensors, *Anal Bioanal Chem* 2002, vol. 372, p. 44–8.

(P. Ortiz *et al.*, 2008) P. Ortiz, N. Keegan, J. Spoors, J. Hedley, A. Harris, J. Burdess, R. Burnett, T. Velten, M. Biehl, T. Knoll, W. Haberer, M. Solomon, A. Campitelli, C. McNeil, A hybrid microfluidic system for cancer diagnosis based on MEMS biosensors, *Biomedical Circuits and Systems Conference*, 2008, p.337 – 340. DOI: 10.1109/BIOCAS.2008.4696943

(T. Oyama *et al.*, 2003) Oyama T, Sykes KF, Samli KN, Minna JD, Johnston SA, Brown KC. Isolation of lung tumor specific peptides from a random peptide library: generation of diagnostic and cell-targeting reagents. *Cancer Lett* 2003, vol. 202, p. 219–30.

(S. Paik, *et al.* 2004) Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004, vol. 351, p. 2817–26.

(NVH. Phan *et al.*, 2014) Phan NVH, Sussitz HF, Lieberzeit PA, Polymerization Parameters Influencing the QCM Response Characteristics of BSA MIP, *Biosensors*, 2014, vol.4, N°2, p. 161-171. DOI: 10.3390/bios4020161

(M. Phillips, *et al.*, 2003) Phillips M, Cataneo R, Ditkoff B, Fisher P, Greenberg J, Gunawardena R, *et al.* Volatile markers of breast cancer in the breath. *Breast J* 2003, vol. 9, N° 3, p.184–91.

(T. Piacham *et al.*, 2005) T. Piacham, A. Josell, H. Arwin, V. Prachayasittikul, L. Ye, “Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator”. *Anal. Chim. Acta.*, 22 Avril 2005, 536, n° 1-2, p. 191-196. DOI : doi:10.1016/j.aca.2004.12.067

(S. Piletsky *et al.*, 2006) Piletsky S, Turner NW, Laitenberger P. Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics-future potential and existing problems. *Med Eng Phys* 2006, vol. 28, p. 971–7.

(S. Piletsky *et al.*, 2006) Piletsky S, Piletska EV, Sergeyeva TA, Nicholls I, Weston D, Turner A. Synthesis of biologically active molecules by imprinting polymerization. *Biopolym Cell* 2006, vol. 22, p. 63–8.

(J.M. Piqué *et al.* 1981) J. M. Piqué, M. Pallares, E. Cuso, J. Vilar-Bonet, and M. A. Gassull, “Methane production and colon cancer,” *Gastroenterology*, 1984, vol. 87, p. 601–605.

(A.A. Qader *et al.* 2014) Qader, A.A., Urraca, J., Torsetnes, S.B., Tønnesen, F., Reubsaet, L., Sellergren, B., Peptide imprinted receptors for the determination of the small cell lung cancer associated biomarker progastrin releasing peptide, *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1370, p. 56-62. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.023

(K. Reimhulta *et al.*, 2008) K. Reimhulta, K. Yoshimatsub, K. Risvedenb, S. Chena, L. Yeb, A. Krozera, “Characterization of QCM sensor surfaces coated with molecularly imprinted nanoparticles”, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, n° 12, p.1908–1914. DOI : 10.1016/j.bios.2008.02.011

(Cancer Research UK, 2008) Cancer Research UK. 2008. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/mortality/>

(J-P. Revillard *et al.* 2001) J-P. Revillard, Immunologie. 4ème édition, De Boeck Supérieur, 11 oct. 2001 - 600 pages. Disponible en ligne à l'adresse : <https://books.google.fr/books?id=1Q99a980wD0C&pg=PA541&lpg=PA541&dq=analyse+scatchard&source=bl&ots=oDQaahvv4J&sig=Rc9BPMwkTaaEHUw83qF8mNCChJU&hl=fr&sa=X&ei=5RS9VLQyA4qvUYyXgKgJ&ved=0CDgQ6AEwAw#v=onepage&q=analyse%20scatchard&f=false>.

(T.H. Rider *et al.*, 2003) Rider, T.H., Petrovick, M.S., Nargi, R.E., Harper, J.D., Schwoebel, E.D., Mathews, R.H., Blanchard, D.J., Bortolin, L.T., Young, A.M., Chen, J., Hollis, M.A. A B Cell-based Sensor for Rapid Identification of Pathogens. *Science*, vol. 301, p. 213-215.

(M. Riskin *et al.*, 2007) M. Riskin, R. Tel-Vered, I. Willner, "The imprint of electropolymerized polyphenol films on electrodes by donor-acceptor interactions: selective electrochemical sensing of N, N'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium (methyl viologen ", *Adv. Funct. Mater.*, 2007, vol. 17, n° 18, p. 3858-3863. DOI : 10.1002/adfm.200700303

(M. Rodriguez *et al.*, 2005) Rodriguez M, Kawde N, Wang J. Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of surface change. *Chem Commun* 2005, vol. 34, p. 4267–9.

(A. Rosenwasser, 1997) A. Rosenwasser, A. Wirz-Justice, Circadian rhythms and depression: clinical and experimental models, in Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms. New York: *Springer-Verlag*, 1997, p. 457–485.

(JS. Ross, *et al.*, 2004) Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, *et al.* Targeted therapy in breast cancer. *Mol Cell Proteomics*, 2004, vol. 3, p. 379–98.

(L. Sabet *et al.*, 2008) Leyla Sabet, Winny Tan, Fang Wei, and Chih-Ming Ho Advances in background-noise reduction lead to ultrasensitive protein and DNA sensors for detecting oral cancer. *Biomedical Optics & Medical Imaging Reading cancer-specific signatures*, 2008. DOI: 10.1117/2.1200810.1327

(M. Sanchez-Carbayo, 2004) Sanchez-Carbayo M. Recent advances in bladder cancer diagnostics. *Clin Biochem* 2004, vol. 37, p. 562–71.

(P. Sarkar *et al.*, 2002) Sarkar P, Pal PS, Ghosh D, Setford SJ, Tothill IE. Amperometric biosensors for detection of the prostate cancer marker (PSA). *Int J Pharm*, 2002, vol. 238, p. 1–9.

(E. Schab-Balcerzak, 2011) E. Schab-Balcerzak, *Electrochemistry Electropolymerization*, Edited by, *InTech*, 2011, p. 226. DOI: 10.5772/11119.

(R.-H. Schmidt *et al.*, 2004) R.-H. Schmidt, K. Mosbach, K. Haupt, “A simple method for spin-coating molecularly imprinted polymer films of controlled thickness and porosity”. *Adv. Mater.*, 26 Avril 2004, Vol. 16, n° 8, p. 719-722. DOI. : 10.1002/adma.200306374

(B. Sellergren *et al.*, 2001) Sellergren, B., Hall, A.J., *Fundamentals aspects on the synthesis and characterization of imprinted network polymers in Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Applications in Analytical Chemistry*, *Elsevier*: Amsterdam, 2001, p.21-57. DOI: 10.1016/S0167-9244(01

(B. Sellergren, 2001) B. Sellergren, *Molecularly Imprinted Polymers*, Elsevier 2001.

(C. Seokheun *et al.*, 2009) C. Seokheun, C. Junseok, *Surface Plasmon Resonance Biosensor based on Vroman Effect: Towards Cancer Biomarker Detection*, *Mixed-Signals, Sensors, and Systems Test Workshop*, 2009, p. 1-3. DOI: 10.1109/IMS3TW.2009.5158683.

(T. Sergeyeva *et al.* 0,1999) Sergeyeva, T.A., Piletsky, S.A., Brovko, A.A., Slinchenko, E.A., Sergeeva, L.M., Elskaya, A.V., *Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes. Development of conductometric sensor for herbicides detection*, *Analytica Chimica Acta*, 1999, vol. 392, N° 2-3, p.105-111. DOI: 10.1016/S0003-2670(99 00225-1.

(KA. Shaikh *et al.*, 2005) Shaikh KA, Ryu KS, Goluch ED, Nam JM, Liu J, Thaxton CS, *et al.* A modular microfluidic architecture for integrated biochemical analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005,vol. 102, p. 9745–50.

(S. Sinn *et al.*, 2011) Sinn, S., Eichler, M., Muller, L., Bunger, D., Groll, J., Ziegler, G., Rupp, F., Northoff, H., Geis-Gerstorfer, J., Gehring, F.K., Wendel, H.P. NCO-sP(EO-stat-PO coatings on gold sensors—A QCM study of hemocompatibility. *Sensors*, 2011, vol. 11, p. 5253–5269.

(SA. Soper *et al.*, 2006) Soper SA, Brown K, Ellington A, Frazier B, Garcia-Manero G, Gau GV, *et al.* Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosens Bioelectron* 2006, vol. 21, p. 1932–42.

(D. Spivak *et al.*, 1997) D. Spivak, M. A. Gilmore, K. J. Shea, Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers, *Am. Chem. Soc.*, 1997, vol. 119, N° 19, p. 4388–4393. DOI: 10.1021/ja963510v.

(D.A. Spivak *et al.*, 2004) Spivak, D.A., Simon, R., Campbell, J., Evidence for shape selectivity in non-covalently imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 504, N°1, p.23-30. DOI: 10.1016/S0003-2670(03 00946-2.

(K. Sreenivasan , 2006) K. Sreenivasan, “Surface imprinted polyurethane film as a chiral discriminator”, *Talanta*, 15 Janvier 2006, vol. 68, n° 3, p. 1037-1039. DOI. : 10.1016/j.talanta.2005.05.005. Epub 2005 Jun 22

(J.E. Szulejko *et al.*, 2010) Jan E. Szulejko, Michael McCulloch, Jennifer Jackson, Dwight L. McKee, Jim C. Walker, and Touradj Solouki, Evidence for Cancer Biomarkers in Exhaled Breath, *IEEE SENSORS JOURNAL*, 2010, vol. 10, N° 1, p. 185-210

(F. Tan *et al.*, 2006) Tan F, Yan F, Ju HX. A designer ormosil gel for preparation of sensitive immunosensor for carcinoembryonic antigen based on simple direct electron transfer. *Electrochem Commun*, 2006, vol. 8, p.1835–9.

(Y. Tan *et al.*, 2001) Y. Tan, Z. Zhou, P. Wang, L. Nie, S. Yao, A study of a bio-mimetic recognition material for the BAW sensor by molecular imprinting and its application for the determination of paracetamol in the human serum and urine, *Talanta*, 2001, vol. 55, N° 2, p. 337-347.

(W. Tana *et al.*, 2008) W. Tana, L. Sabet, Y. Li, T. Yu, P. Klokkevold, D. Wongb, C. Ho, Optical protein sensor for detecting cancer markers in saliva. *Biosens Bioelectron*. 2008, vol. 24, N° 2, p. 266-71. DOI: 10.1016/j.bios.2008.03.037.

(NC. Tansil *et al.*, 2005) Tansil NC, Xie F, Xie H, Gao Z. An ultrasensitive nucleic acid biosensor based on the catalytic oxidation of guanine by a novel redox threading intercalator. *Chem Commun*, 2005, vol. 8, p. 1064–6.

(O. Tigli *et al.*, 2008) O. Tigli, L. Bivona, C.Chaterjee, M. E. Zaghloul, P. Berg, Surface Acoustic Wave Based Biosensor in CMOS for Cancer Biomarker Detection, *IEEE SENSORS* 2008.

(O. Tigli *et al.* 2010) O. Tigli, L. Bivona, P. Berg, M. E. Zaghloul, Fabrication and Characterization of a Surface-Acoustic-Wave Biosensor in CMOS Technology for Cancer Biomarker Detection, *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL CIRCUITS AND SYSTEMS* 2010, vol. 4, N°. 1.

(IE. Tothill *et al.*, 2001) Tothill IE, Piletsky S, Magan N, Turner APF. New biosensors. In: Kress-Rogers E, Brimelow CJB, editors. Instrumentation and sensors for the food industry, 2nd ed. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*, 2001. p. 760–76.

(IE. Tothill, 2001) Tothill IE. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. *Comput Electron Agric* 2001, vol. 30, p. 205–18.

(I-E. Tothill, 2009) Biosensors for cancer markers diagnosis, *Seminars in Cell & Developmental Biology, Elsevier Journal*, 2009, vol. 20, p. 55–62.

(L. Truta *et al.*, 2014) T. LAAN, F. NS, S. MGF, Graphene-based biomimetic materials targeting urine metabolite as potential cancer biomarker: Application over different conductive materials for potentiometric transduction. *Electrochimica Acta Journal*, 2014, vol. 150, p. 99-107. DOI: 10.1016/j.electacta.2014.10.136.

(Y. Uludag *et al.*, 2009) Uludag Y, Tothill IE. Real-time detection of prostate specific antigen (PSA in human serum using a fully automated QCM biosensor. *Anal Chem Acta*, 2010.

(J.L. Urraca *et al.*, 2007) J.L. Urraca, M.C. Moreno-Bondi, G. Orellana, B. Sellergren, A.J. Hall, Molecularly Imprinted Polymers as Antibody Mimics in Automated On-Line Fluorescent Competitive Assays, *Anal. Chem.*, 2007, vol. 79, p. 4915.

(F. Vandeveld *et al.*, 2007) F. Vandeveld, T. Leichle, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, K. Haupt, *Langmuir*, 2007, vol. 23, n° 12, p.6490–6493. DOI : 10.1021/la700320n

(A. Vickers *et al.* 2013) A. J. Vickers *et al.*, Strategy for detection of prostate cancer based on relation between prostate specific antigen at age 40-55 and long term risk of metastasis: case control study, *OPEN ACCESS BMJ*, 2013.

(F. Vilaplana *et al.*, 2004) F. Vilaplana, M. Osorio-Galindo, A. Iborra-Clar, M. I. Alcaina-Miranda, A. Ribes-Greus, Swelling behavior of PDMS–PMHS pervaporation membranes in ethyl acetate–water mixtures, *Inc Journal of Applied Polymer Science*, 2004, vol. 93, N° 3, p. 1384–1393.

(T. Vilkner *et al.*, 2004) T. Vilkner, D. Janasek, A. Manz, “Micro Total Analysis Systems. Recent Developments”, *Anal. Chem.*, 24 Avril 2004, vol. 76, n° 12, p. 3373-3385. DOI : 10.1021/ac040063q

(F-A. Villamena *et al.*, 2001) Frederick A. Villamena and Armah A. De La Cruz, Caffeine selectivity of divinylbenzene crosslinked polymers in aqueous media, *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, vol. 82, N° 1, p. 195–205. DOI: 10.1002/app.1839.

(J. Wang *et al.*, 2000) Wang J, Kawde A. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal Chim Acta*, 2000, vol. 431, p. 219–25.

(J. Wang *et al.* 2006) Wang J. Electrochemical biosensors: towards point of care cancer diagnostics. *Biosens Bioelectron*, 2006, vol. 21, p. 1887–92.

(Y. Wang *et al.*, 2010) Wang, Y., Zhang, Z., Jain, V., Yi, J., Mueller, S., Sokolov, J., Liu, Z., Levon, K., Rigas, B., Rafailovic, M.H. Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses. *Sens. Actuator. B*. 2010, vol. 146, p. 381–387.

(T. Wangchareansak *et al.*, 2011) Wangchareansak, T., Sangma, C., Choowongkomon, K., Dickert, F.L., Lieberzeit, P.A. Surface molecular imprints of WGA lectin as artificial receptors for mass-sensitive binding studies. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, vol. 400, p. 2499–2506.

(KW. Wee *et al.*, 2005) WeeKW, KangGY, Park J, Kang J,YoonY, Park DS, *et al.* Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing microcantilevers. *Biosens Bioelectron* 2005, vol. 20, p.1932–8.

(G.M. Whitesides *et al.*, 2003) G.M. Whitesides, The 'Right' Size in Nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* 2003, vol.21, p.1161-1165.

(MS. Wilson, 2005) Wilson MS. Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers. *Anal Chem*, 2005, vol. 77, p. 1496–502.

(G. Wu *et al.*, 2001) Wu G, Datar RH, Hansen KM, Thundat T, Cote RJ, Majumdar A. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA using microcantilevers. *Nat Biotechnol* 2001, vol. 19, p. 856–60.

(J. Wu *et al.*, 2007) Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *Trends Anal Chem* 2007, vol. 26, p. 679–88.

(J. Wu, Z. Zhang *et al.*, 2007) Wu J, Zhang Z, Fu Z, Ju H. A disposable two-throughput electrochemical immunosensor chip for simultaneous multianalyte determination of tumor markers. *Biosens Bioelectron* 2007, vol. 23, p. 114–20.

(G. Wulff *et al.*, 1972) G. Wulff, A. Sarhan, Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung (a way towards artificial antibodies , *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1972, vol. 84, p. 364.

(P. Yager *et al.*, 2006) P. Yager, T. Edwards, E. Fu, K. Helton, K. Nelson, M.R. Tam, B.H. Weigl, “Microfluidic Diagnostic Technologies for Global Public Health”, *Nat. Biotechnol.*, 27 Juillet 2006, vol. 442, p. 412-418. DOI : 10.1038/nature05064, Published online 26 July 2006

(M. Yan *et al.*, 2004) M. Yan, O. Ramstrom, Molecularly Imprinted Materials: *Science and Technology*, CRC Press, New York, USA, 2004.

(H.-H. Yang *et al.*, 2004) H.-H. Yang, S.-Q. Zhang, W. Yang, X.-L. Chen, Z.-X. Zhuang, J.G. Xu, X.R. Wang, “Molecularly imprinted sol-gel nanotubes membrane for biochemical separations”, *J. Am. Chem. Soc.*, Avril 2004, vol. 126, n° 13, p. 4054-4055. DOI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15053564>

(B. Zhang *et al.*, 2004) Zhang B, Mao QG, Zhang X, Jiang TL, Chen M, Yu F, *et al.* A novel piezoelectric quartz micro-array immunosensor based on self-assembled monolayer for determination of human chorionic gonadotropin. *Biosens Bioelectron* 2004, vol. 19, p. 711–20.

(L. Zhao *et al.* 2007)) L. Zhao, H. Ping, L. Xiang, P. Han, J. Wang, L. Pan, “Application of Molecular Imprinting Technique in Organophosphorus Pesticides Detection”, Computer and Computing Technologies in Agriculture IV, *Advances in Information and Communication Technology*, vol 344, p. 290-295. DOI :10.1007/978-3-642-18333-1_34

(XC. Zhou *et al.*, 2001) Zhou XC, Huang LQ, Li SFY. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis. *Biosens Bioelectron*, 2001, vol. 16, p. 85–95.

(XD. Zhou *et al.* 2002) Zhou XD, Liu LJ, Hu M, Wang LL, Hu JM. Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor. *J Pharm Biomed Anal* 2002, vol. 27, p. 341–5.

(Q. Zhu *et al.*, 2005) Zhu Q, Chai YQ, Yuan R, Wang N, Li XL. Development of a biosensor for the detection of carcinoembryonic antigen using Faradic impedance spectroscopy. *Chem Lett* 2005, vol. 34, p. 1682–3.

(V. Zieglschmid *et al.*, 2005) Zieglschmid V, Hollmann C, Gutierrez B, Albert W, Strothoff D, Gross E, *et al.* Combination of immunomagnetic enrichment with multiplex RTPCR analysis for the detection of disseminated tumor cells. *Anticancer Res*, 2005, vol. 25, p.1803–10.

(M. Zougagh *et al.*, 2005) Zougagh, M., Ríos, A., Valcárcel, M., Automatic selective determination of caffeine in coffee and tea samples by using a supported liquid membrane-modified piezoelectric flow sensor with molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 539, N°1-2, p.117-124. DOI: 10.1016/j.aca.2005.02.060.

(Feng *et al.*, 2005) Feng B, Zheng MH, Zheng YF, *et al.* Normal and modified nucleosides represent novel biomarkers for colorectal cancer diagnosis and surgery monitoring. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005, 20, 1913.

(Touitou *et al.*, 1996) Touitou Y, Bogdan A, Lévi F, Benavides M, Auzéby A., Disruption of the circadian patterns of serum cortisol in breast and ovarian cancer patients: relationships with tumor marker antigens. *Br. J. Cancer.* 1996, 74, 1248.

(Yang *et al.*, 2002) Yang J, Xu G, Kong H, Zheng Y, Pang T, Yang Q. Artificial neural network classification on highperformance liquid chromatography of urinary and serum nucleosides for the clinical diagnosis of cancer. *J. Chromatogr. B* 2002, 780, 27.

(Bullinger *et al.* 2008) Bullinger D, Frohlich H, Klaus F, Neubauer H, Frickenschmidt A, Hennes C, Zell A, Laufer S, Gleiter CH, Liebich H, Kammerer B, Bioinformatical evaluation of modified nucleosides as biomedical markers in diagnosis of breast cancer. *Anal. Chim. Acta* 2008, 618, 29.

(Hsu *et al.*, 2009) Hsu WY, William Chen WTL, Lin WD, Tsai FJ, Tsai Y, Lin CT, Lo WY, Jeng LB, Lai CC, Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 2009, 402, 31.

(Thomale et al. 1984) Thomale J, Luz A, Nass G, Excretion of modified nucleosides during development of malignant lymphomas in mice after whole body irradiation, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1984, 108, 302.